

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo em Tempo Real e *In vivo* da Regulação do
Metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* pelo H_2O_2**

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica

Rafael Nogueira Bento

Dissertação orientada por:
Fernando José Nunes Antunes
Manuel Eduardo Minas da Piedade

Agradecimentos

Começo por agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e ao Departamento de Química e Bioquímica pelo percurso académico que me proporcionou até então.

Agradeço imenso aos meus orientadores, os Professores Fernando Antunes e Manuel Minas da Piedade, pelo apoio constante que me deram ao longo deste ano. Sem as suas ideias, os artigos e disponibilidade teria sido impossível apresentar este trabalho.

De seguida, quero agradecer aos meus colegas de laboratório da calorimetria e das leveduras. Gostava de destacar o Carlos que, sempre que alguma coisa parava inexplicavelmente de funcionar, tinha sempre disponibilidade para me ajudar e arranjou solução para todos os problemas. Não me posso esquecer do Daniel, que foi um colega das leveduras espetacular.

Como é óbvio, tenho que agradecer à Professora Luísa Cyrne pela excelente companhia que me proporcionou, pela preocupação, pelos ensinamentos, por todas as placas e, mais importante ainda, pelo material de vidro que tantas vezes me ajudou a preparar.

Como não poderia nunca deixar de ser, agradeço infinitamente ao G2, o melhor grupo de amigos/trabalho que qualquer pessoa poderia ter na faculdade e no resto da vida. A todos os membros do G2, Catarina, Carolina, Andreia e Rita, não se esqueçam que se tornaram efetivos no grupo. Ao Fadhil (Fadigas) que, apesar de não ser membro do G2, está no mesmo lote.

Agradeço à minha mãe. Principalmente por ter oportunidade de o fazer.

Tenho necessariamente que agradecer ao meu pai por me ter apoiado de todas as formas e ter permitido chegar a este momento. Também quero agradecer ao resto da minha família, principalmente à minha tia Teresa e avó Virgínia, que estiveram sempre presentes.

Por último, à Catarina, pelo apoio e carinho constantes, tal como pelas excelentes ideias e discussões. Apesar de membro permanente do G2, merece este novo destaque. O porquê é óbvio e não há necessidade de dizer mais.

Resumo

A microcalorimetria deteta o fluxo de calor associado à amostra analisada, sendo uma técnica com uma elevada sensibilidade e capaz de acompanhar o metabolismo celular em tempo real e em condições não-invasivas. Os resultados das experiências calorimétricas, regra geral, são apresentados sob a forma de curvas de fluxo de calor vs tempo ($\Delta\phi-t$) ou de potência dissipada vs tempo (curvas $P-t$). A curva $P-t$ associada ao crescimento de vários microrganismos, como a *Saccharomyces cerevisiae*, geralmente, com a glucose como fonte de carbono e energia já foi alvo de diversos estudos. É possível associar singularidades observadas na curva $P-t$ a fenómenos biológicos específicos (ex: transição diáuxica) e analisar a resposta metabólica a vários *stresses*, como o efeito de antibióticos sobre vários microrganismos. Apesar de existirem evidências que sugerem que o metabolismo celular é altamente dinâmico e que a potência dissipada por célula varia ao longo do crescimento, este assunto tem sido ignorado. Aliás, é muito comum assumir que cada fase de crescimento tem uma potência dissipada por célula constante.

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é uma molécula biológica ubíqua que atua como sinalizador intracelular a doses baixas, mas induz *stress* oxidativo a doses altas. É conhecido que as células desenvolvem uma resposta adaptativa contra doses sub-letais de H_2O_2 , adquirindo uma maior resistência contra o *stress* oxidativo moderado induzido por este oxidante. Em *S. cerevisiae*, esta é uma resposta metabólica global que envolve vários processos celulares e afeta, por exemplo, a permeabilidade membranar ao H_2O_2 , o metabolismo catabólico da glucose e a proliferação celular.

Neste trabalho, acompanhou-se o crescimento e metabolismo celular da *S. cerevisiae* com a glucose como fonte principal de carbono e energia na presença e ausência de H_2O_2 por calorimetria de condução de calor e medições de densidade ótica a 600 nm (OD_{600}). A exposição celular ao H_2O_2 realizou-se durante a fase exponencial por

(i) três adições bolus de 150 μM intervaladas de 40 min ($\text{H}_2\text{O}_{2\text{bolus}}$) ou, (ii) por uma dose estacionária de 150 μM durante 90 min, que resulta numa dose final de cerca de 600 μM ($\text{H}_2\text{O}_{2\text{ss}}$). Os objetivos deste trabalho foram: (i) perceber como é que a potência dissipada por célula varia durante o crescimento; (ii) desenvolver um novo método de administração de uma dose estacionária de H_2O_2 independente de enzimas; (iii) comparar as respostas metabólicas celulares a adições bolus ou a uma dose estacionária de H_2O_2 .

A análise quantitativa dos perfis das curvas P - t e OD_{600} - t permitiu concluir que: (i) o metabolismo celular está continuamente a ajustar-se e encontra-se mais ativo durante a fase lag; (ii) fases de crescimento associadas a uma reprogramação metabólica extensa (fase lag e início da pós-diáuxica) têm um desvio energético para a divisão celular baixo; (iii) o metabolismo respiratório permite um maior direcionamento energético para a divisão celular, apesar de estar associado a uma taxa de crescimento menor; (iv) a exposição ao $\text{H}_2\text{O}_{2\text{bolus}}$ causa um decréscimo da taxa de crescimento da fase exponencial de cerca de 4 % e reduz o calor libertado associado à fermentação da glucose por cerca de 20 % ($77 \pm 3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) em relação ao controlo ($96 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), implicando grandes alterações metabólicas; (v) a exposição a $\text{H}_2\text{O}_{2\text{ss}}$ também causa um decréscimo de cerca de 4 % da taxa de crescimento da fase exponencial, mas não afeta o calor libertado associado ao consumo da glucose ($90 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) e, de facto, aumenta a resistência celular ao *stress* oxidativo associado ao metabolismo respiratório da fase pós-diáuxica, resultando numa maior proliferação celular.

Concluindo, a potência dissipada por célula, altamente variável, revela que o metabolismo está num estado dinâmico ao longo de toda a curva de crescimento e não num estado estático como é muitas vezes assumido. Esta observação mostra que a assunção típica de que, em certos períodos do crescimento, a potência dissipada pela população celular varia de forma linear com o número de células é incorreta. A *S.*

cerevisiae favorece o consumo fermentativo da glucose em relação ao oxidativo porque, apesar de menos eficiente, permite uma taxa de crescimento maior. Esta observação suporta a ideia geral de que o metabolismo das células cancerosas está otimizado para a proliferação celular máxima e não para a eficiência energética máxima, uma vez que este tipo de células também favorece o metabolismo fermentativo.

A resposta ao H_2O_2 varia dependendo do seu modo de administração, com a adição bolus a exigir um maior gasto energético que a dose estacionária. Esta observação está de acordo com a ideia de que um *stress* pulsado conduz a uma resposta celular menos eficiente que um contínuo. Além disso, a maior proliferação celular das culturas expostas à dose estacionária de H_2O_2 contradiz o compromisso entre a divisão celular e a resposta a *stresses* tipicamente assumido.

Palavras-chave: microcalorimetria; *S. cerevisiae*; metabolismo celular; H_2O_2 ; *stress* oxidativo

Abstract

Microcalorimetry measures the heat flow associated to the analyzed sample and has proved to be a very sensitive technique to follow cell metabolism in real time under non-invasive conditions. The results of those experiments are normally given as heat-flow rate versus time ($\Delta\phi$ - t) or power versus time (P - t) curves. The P - t curve associated to the growth of various microorganisms, such as *S. cerevisiae*, mainly with glucose as the carbon and energy source has been the subject of various studies. It is possible to detect signatures of specific biological events (e.g. diauxic shift) and of cell responses to various stresses, such as the effect of antibiotics on several microorganisms. Albeit there is evidence that cell metabolism is highly dynamic and that the dissipated power per cell changes during growth, this subject has been overlooked. Moreover, the assumption that each growth phase has a constant dissipated power per cell is very common.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is a ubiquitous biological molecule that has intracellular signaling functions at low doses, but causes oxidative stress at high doses. It is known that cells develop an adaptive response against sub-lethal H_2O_2 doses, becoming more resistant to mild-oxidative stress induced by this oxidant. In *S. cerevisiae*, this is a global metabolic response that involves various cellular processes and affects, for example, membrane permeability to H_2O_2 , glucose catabolism, and cell proliferation.

In this work, cellular growth and metabolism of *S. cerevisiae* with glucose as the main carbon and energy source was followed in the absence and presence of H_2O_2 by using heat-conduction flow calorimetry and optical density measurements. H_2O_2 was added during the exponential phase of growth through (i) three 150 μM consecutive H_2O_2 bolus doses at times 0, 40 and 80 min ($\text{H}_2\text{O}_{2\text{bolus}}$) or, (ii) a 150 μM H_2O_2 steady-state, obtained by delivering approximately 600 μM H_2O_2 during 90 min ($\text{H}_2\text{O}_{2\text{ss}}$). The aims of this work were: (i) to understand how the dissipated power per cell varies during growth;

(ii) to develop a new, enzyme free, steady-state H_2O_2 delivery method; (iii) to compare cellular metabolic responses to H_2O_2 delivered either as three consecutive bolus (single) additions or as a steady-state.

A detailed quantitative analysis of the obtained P - t and optical density curves led to the following main observations: (i) cell metabolism is continuously adjusting itself and is most active during the lag-phase of growth; (ii) periods associated to an extensive metabolic reprogramming (lag and early diauxic phases) have a low energy deviation to cellular division; (iii) respiratory metabolism allows a higher energy deviation to cell division than fermentative metabolism, despite being associated to a lower growth rate; (iv) exposure to $\text{H}_2\text{O}_{2\text{bolus}}$ decreases cell growth rate by near 4 % during exponential phase and decreases the released heat associated to glucose fermentation by 20 % ($77 \pm 3 \text{ kJ.mol}^{-1}$) when compared to control ($96 \pm 7 \text{ kJ.mol}^{-1}$), implying major metabolic changes; (v) exposure to $\text{H}_2\text{O}_{2\text{ss}}$ also reduces the cell growth rate by about 4 % but does not change the heat produced by glucose fermentation ($90 \pm 4 \text{ kJ.mol}^{-1}$) and, in fact, improves cell resistance to the oxidative stress associated to the diauxic phase of growth leading to an increased cell proliferation.

In conclusion, the dissipated power per cell is continuously changing, thus revealing that cell metabolism is highly dynamic and not a steady-state process as is commonly assumed. The common assumption that in some periods of the growth phases the power dissipated by the cell population varies linearly with the cell number is incorrect. *S. cerevisiae* prefers fermentative over oxidative consumption of glucose because, despite less efficient, allows a higher growth rate. This observation supports the idea that cancer cell metabolism is optimized towards maximum cell proliferation and not to maximum energetic efficiency, as fermentative metabolism is also favored in this type of cells.

Response to H₂O₂ is strongly path-dependent, with bolus exposure triggering a higher energetic cost than steady-state exposure. This observation is in agreement with the idea that a pulsated stress leads to a less efficient response than a continuous one. It is finally interesting to note that the higher cell proliferation shown by cultures exposed to H₂O₂ steady-state additions contradicts the commonly assumed trade-off between cell growth and stress response.

Keywords: microcalorimetry; *S. cerevisiae*; cell metabolism; H₂O₂; oxidative stress

Índice

Resumo	4
Abstract	7
1. Introdução	15
1.1 Introdução geral à calorimetria e as suas aplicações	15
1.2 Descrição da calorimetria isotérmica e de condução de calor	16
1.2.1 Descrição do seu funcionamento	16
1.2.2 Vantagens e desvantagens	18
1.3 Aplicação da calorimetria ao estudo do crescimento de microrganismos	19
1.3.1 Caracterização metabólica do crescimento da <i>S. cerevisiae</i>	20
1.3.1.1 Fase lag	21
1.3.1.2 Fase exponencial	22
1.3.1.3 Fase pós-diáuxica	23
1.3.1.4 Fase estacionária	24
1.3.2 Termodinâmica do crescimento da <i>S. cerevisiae</i>	25
1.4 <i>S. cerevisiae</i> e a sua relação com o H ₂ O ₂	27
1.4.1 H ₂ O ₂ e outras espécies reativas de oxigénio como moléculas sinalizadoras e fontes de <i>stress</i>	28
1.4.2 Resposta adaptativa da <i>S. cerevisiae</i> ao H ₂ O ₂	30
1.4.3 Estudos do H ₂ O ₂ com adições bolus vs estado estacionário	33
1.5 Objetivos	36
2. Materiais e métodos	38
2.1 Materiais	38
2.2 Estirpes de levedura, meio e condições de crescimento	38
2.3 Equipamento	39
2.4 Calibração e aquisição de dados	42
2.5 Testes ao calorímetro	44
2.5.1 Determinação da constante de calibração para H ₂ O, meio e culturas em fase estacionária	44
2.5.2 Efeito da adição de H ₂ O ₂ a H ₂ O e meio	46
2.6 Estudo das diferentes fases do crescimento da <i>S. cerevisiae</i> por calorimetria	48
2.6.1 Associação entre o número de células e a densidade ótica	48
2.6.2 Análise do crescimento de culturas de <i>S. cerevisiae</i>	48
2.7 Estudo da resposta da <i>S. cerevisiae</i> a adições bolus e contínuas de doses sub-letais de H ₂ O ₂	49

2.7.1 Exposição das culturas de <i>S. cerevisiae</i> a uma adição de uma dose estacionária de H ₂ O ₂	49
2.7.1.1 Exposição ao H ₂ O ₂	51
2.7.2 Exposição das culturas de <i>S. cerevisiae</i> a adições bolus de H ₂ O ₂	52
2.8 Estatística	54
3. Tratamento de resultados	54
3.1 Estudo das diferentes fases do crescimento da <i>S. cerevisiae</i> por calorimetria	54
3.1.1 Análise da potência dissipada ao longo do crescimento celular	54
3.1.2 Análise da potência dissipada por célula ao longo de uma curva de crescimento	58
3.1.3 Estudo da variação do aproveitamento energético para a divisão celular ao longo do crescimento	66
3.1.4 Análise das oscilações metabólicas da <i>S. cerevisiae</i> detetadas por calorimetria	69
3.2 Estudo da resposta da <i>S. cerevisiae</i> a adições bolus e a um estado estacionário de doses sub-letais de H ₂ O ₂	71
3.2.1 Estudo da resposta imediata da <i>S. cerevisiae</i> ao H ₂ O ₂	71
3.2.1.1 Cálculo teórico para a entalpia associada à resposta imediata da <i>S. cerevisiae</i> ao H ₂ O ₂ e comparação com a experimental	73
3.2.2 Mecanismo de resposta global da <i>S. cerevisiae</i> ao H ₂ O ₂	76
3.2.3 Efeito do H ₂ O ₂ sobre o aproveitamento energético para a divisão celular ao longo do crescimento	82
4. Discussão e Conclusões	86
4.1 A transição diáuxica não é detetada imediatamente por calorimetria	86
4.2 O metabolismo celular da <i>S. cerevisiae</i> é altamente dinâmico durante todo o seu crescimento	88
4.3 A distribuição energética entre os vários processos celulares não é constante durante o crescimento da <i>S. cerevisiae</i>	90
4.4 O metabolismo de células de <i>S. cerevisiae</i> é diferentemente afetado pelo H ₂ O ₂ administrado por adições bolus vs por uma dose estacionária	92
4.4.1 Efeito do H ₂ O ₂ no metabolismo catalítico da glucose	92
4.4.2 Compromisso entre a resposta ao <i>stress</i> induzido pelo H ₂ O ₂ com a proliferação celular	94
5. Perspetivas	96
6. Referências	98
7. Anexos	106

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da transferência de calor entre uma célula calorimétrica (ou referência) e um dissipador de calor num processo exotérmico (A) ou endotérmico (B) e da sua detecção por termopilhas.	18
Figura 2. Esquema representativo de uma curva de crescimento típica.	21
Figura 3. Esquema representativo de uma curva $P-t$ associada ao crescimento de microrganismos típica.	27
Figura 4. Equipamento utilizado para acompanhar o crescimento e metabolismo celulares por calorimetria.	40
Figura 5. Diferença de potencial em função do tempo durante três calibrações elétricas em H_2O millipore.	45
Figura 6. Efeito da adição de H_2O_2 ao meio (linha escura) e a H_2O (linha clara).	47
Figura 7. Curvas de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> seguidas pela potência dissipada e OD_{600}	55
Figura 8. Curva de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> seguida pela potência dissipada e representação do logaritmo neperiano do simétrico da diferença de potencial medida, $\ln(-V)$, em função do tempo.	57
Figura 9. Comparação do crescimento da <i>S. cerevisiae</i> seguida pela medição da OD_{600} e por contagem de células num hemocitómetro.	59
Figura 10. Correlação entre o número de células/mL, $n_{células}$, em função da OD_{600} para diferentes culturas de <i>S. cerevisiae</i>	60
Figura 11. Crescimento da <i>S. cerevisiae</i> seguido pela potência dissipada e valor da potência dissipada por célula durante as várias fases de crescimento.	61
Figura 12. Logaritmo neperiano do simétrico da diferença de potencial medida ($\ln(-V)$) e potência dissipada por célula durante o crescimento da <i>S. cerevisiae</i>	63
Figura 13. Identificação dos períodos do crescimento celular da <i>S. cerevisiae</i> utilizados para analisar o seu direcionamento metabólico. Seguiu-se o crescimento por medições de OD_{600} e este foi comparado com o simétrico da diferença de potencial medida na população celular total ($\ln(-V)$).	66
Figura 14. Comportamento oscilatório associado à potência dissipada total e por célula durante a fase exponencial e pós-diáuxica.	70
Figura 15. Comportamento oscilatório associado à potência dissipada total e por célula no período entre as 9 e as 9,5h da figura anterior.	70
Figura 16. Efeito de três adições bolus de H_2O_2 na potência dissipada total e normalizada por célula.	72

Índice de Quadros

Quadro 1. Constante de calibração do calorímetro obtida com H ₂ O, meio e culturas em fase estacionária.	46
Quadro 2. Valor da variação potência dissipada por célula ao longo do crescimento, para as culturas controle de <i>S. cerevisiae</i>	65
Quadro 3. Análise da variação do direcionamento metabólico para o crescimento celular ao longo das várias fases de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> para as culturas controle.	67
Quadro 4. Potência associada à resposta imediata ao H ₂ O ₂ (ΔH) nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> expostas a três adições bolus ou a uma dose estacionária.	73
Quadro 5. Entalpias de formação molar dos reagentes/produtos das reações catalisadas pelos catalases, citocromo c peroxidases e pelos glutathione peroxidases ou peroxirredoxinas em condições padrão.....	74
Quadro 6. Descrição das curvas <i>P-t</i> , para as culturas controle e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H ₂ O ₂	77
Quadro 7. Entalpia de oxidação da glucose a etanol e completa para as culturas controle e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H ₂ O ₂	80
Quadro 8. Análise do efeito do H ₂ O ₂ sobre o crescimento celular a partir dos μ da fase exponencial.	80
Quadro 9. Taxas de crescimento para as várias fases de crescimento das culturas controle e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H ₂ O ₂	83
Quadro 10. Velocidade da variação da potência dissipada para os períodos descritos na figura 13 e no quadro 3 das culturas controle e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H ₂ O ₂	83
Quadro 11. Aproveitamento energético para a divisão celular para os períodos descritos na figura 13 e no quadro 3 das culturas controle e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H ₂ O ₂	84
Quadro 12. Densidade ótica determinada na transição diáuxica e no início da fase estacionária.	86

Lista de abreviaturas

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

EROs – espécies reativas de oxigénio

Curvas *P-t* – curvas potência dissipada vs tempo

ATP – trifosfato de adenosina

GO – glucose oxidase

OD₆₀₀ – densidade ótica a 600 nm

CCP – citocromo c peroxidase

GPx – glutathione peroxidase

Prx – peroxirredoxinas

1. Introdução

O objetivo principal deste trabalho foi estudar, em tempo real, o metabolismo da *S. cerevisiae* na ausência e na presença de um *stress* oxidativo moderado causado pelo H_2O_2 , usando calorimetria para medir o calor associado à atividade metabólica. Assim, um dos papéis da presente introdução é justificar o recurso à calorimetria isotérmica e de condução de calor para estudar o metabolismo de microrganismos. Para isso, vai-se abordar o funcionamento deste tipo de calorimetria, quais as suas vantagens e fazer um ponto da situação relativamente à aplicação da calorimetria para o estudo de microrganismos. Pretende-se também clarificar as razões que levaram ao uso da *S. cerevisiae* como modelo experimental e descrever o seu crescimento em culturas líquidas, em condições aeróbias, em *batch* e com a glucose como fonte principal de carbono e energia, tal como as utilizadas neste trabalho. E, por último, pretende-se explicar resumidamente a resposta complexa e multifatorial ao *stress* oxidativo induzido pelo H_2O_2 observada neste trabalho

1.1 Introdução geral à calorimetria e as suas aplicações

A calorimetria consiste numa técnica que mede fluxos de calor associados a processos químicos ou físicos de forma contínua e em tempo real. O seu uso iniciou-se no século XVIII e, desde então, foram produzidos diversos tipos de calorímetros altamente precisos e sensíveis. No âmbito da Biologia, Bioquímica e Biomedicina a calorimetria tem sido utilizada, por exemplo, para: (i) detetar e determinar infeções mais rapidamente que pelos métodos microbiológicos (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a); (ii) detetar e identificar microrganismos em solos e águas (Lamprecht, 2003, Braissant *et al.*, 2010a, Braissant *et al.*, 2013); (iii) analisar diferenças metabólicas entre estirpes diferentes do mesmo microrganismo (Lamprecht *et al.*, 1976); (iv) estudar a resposta metabólica de

microrganismos a antibióticos (permite uma análise do seu efeito a doses muito mais baixas que os métodos tradicionais) e a outros tipos de *stress* de uma forma muito mais informativa e rápida (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a, Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Garedew *et al.*, 2004, Lamprecht, 2003, Braissant *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2000); (v) analisar a termodinâmica e a cinética do crescimento celular (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Larsson *et al.*, 1993, Yonsel *et al.*, 2007, Lamprecht, 2003, Li *et al.*, 2000); (vi) estudar a interação entre ligandos (Braissant *et al.*, 2010a); (vii) estudar reações enzimáticas (Nelson & Kiesow, 1972, Bianconi, 2007). Nalguns casos, a calorimetria está até a fornecer informações que dificilmente seriam obtidas com os métodos tradicionais associados à microbiologia, além de evitar várias das dificuldades que lhes estão associados (Garedew *et al.*, 2004, Lamprecht, 2003, Li *et al.*, 2000). Por exemplo, Garedew *et al.* estudaram o efeito antibiótico do mel da abelha *Trigona spp.* sobre vários tipos de bactérias. A concentração mínima inibitória obtida por calorimetria foi várias vezes inferior às obtidas por crescimento em placas ou espectralmente, devido à sensibilidade muito superior da calorimetria relativamente a esses métodos e foi obtida de forma muito mais rápida (Garedew *et al.*, 2004). O surgimento de cada vez mais calorímetros com diferentes características e o seu acoplamento a outras técnicas (sensores para detetar e quantificar metabolitos, entre outros) está a permitir uma rápida evolução da calorimetria e espera-se que o seu uso se torne gradualmente mais globalizado.

1.2 Descrição da calorimetria isotérmica e de condução de calor

1.2.1 Descrição do seu funcionamento

Hoje em dia existem diversos tipos de calorímetros, que são distinguidos, principalmente, pelo destino do fluxo de calor associado à amostra e pela relação térmica e física do calorímetro com a sua vizinhança (Braissant *et al.*, 2010). Existem, por exemplo, calorímetros isotérmicos, de pressão constante, de volume constante, entre

outros (Braissant *et al.*, 2010a). Um dos tipos de calorímetros mais comuns são os microcalorímetros isotérmicos, que na maior parte são calorímetros de condução de calor (Braissant *et al.*, 2010a), tal como o utilizado neste trabalho. O termo isotérmico está associado ao modo de funcionamento deste tipo de calorímetros, em que se mede o fluxo de calor na ordem dos microwatts (μW ou $\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$) a uma temperatura quase constante (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a). O termo condução de calor refere-se ao modo de deteção do sinal, que se baseia na transferência de calor entre a célula calorimétrica, onde se encontra a amostra em análise, e um dissipador de calor, mantidos a uma temperatura aproximadamente constante pelo sistema termostático. Na ausência de qualquer processo químico ou físico, as temperaturas da célula e do dissipador de calor são iguais. No entanto, quando há algum destes processos em curso, seja exo ou endotérmico, vai haver uma transferência de calor entre a célula e o dissipador de calor. Quando há libertação de calor na célula, este vai ser transferido para o dissipador de calor. Pelo contrário, quando há consumo de calor na célula, vai haver uma transferência de calor do dissipador para a célula. Esta transferência de calor é monitorizada por termopilhas, localizadas entre a célula calorimétrica e o dissipador de calor, que detetam pequenas variações de temperatura associadas ao fluxo de calor entre a célula calorimétrica e o dissipador de calor (Braissant *et al.*, 2010a). Este processo está esquematizado na figura 1. As pequenas variações de temperatura mencionadas são detetadas e convertidas para um sinal elétrico (diferença de potencial, $\text{V}/\mu\text{V}$), que pode ser convertido para a potência dissipada (P , μW) pela amostra (Braissant *et al.*, 2010), obtendo-se as típicas curvas de potência dissipada em função do tempo (t) (curvas P - t) associadas à microcalorimetria. De maneira a obter sensibilidade e precisão máximas, na maior parte deste tipo de calorímetros existe uma célula-referência inerte (acompanhada de um dissipador de calor e de termopilhas iguais aos da célula calorimétrica, de

preferência), com características semelhantes às da célula calorimétrica (condutividade e capacidade térmicas), que é usada para comparar o seu fluxo de calor com o da célula calorimétrica (Braissant *et al.*, 2010a). Deste modo, quaisquer variações de temperatura que afetem o calorímetro vão ter o mesmo impacto sobre ambas as células, pelo que não deverão ter influência no sinal obtido.

1.2.2 Vantagens e desvantagens

As vantagens da calorimetria isotérmica são: uso de volumes de amostra pequenos e o acompanhamento de, praticamente, qualquer processo (porque é possível detetar diferenças de temperatura extremamente pequenas) (Braissant *et al.*, 2010); é uma técnica passiva, ou seja, não causa nem necessita de quaisquer modificações/perturbações sobre a amostra em estudo (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a, Larsson *et al.*, 1993); por ser um método não-destrutivo permite a análise da mesma amostra por outras técnicas (Braissant *et al.*, 2010a); faz medições em tempo real e de forma contínua (Braissant *et al.*, 2010a, Lamprecht, 2003), tem uma elevada sensibilidade (deteta fluxos de calor na ordem dos nano ou microwatts), precisão e reprodutibilidade (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a). No entanto, também está associada a algumas desvantagens como,

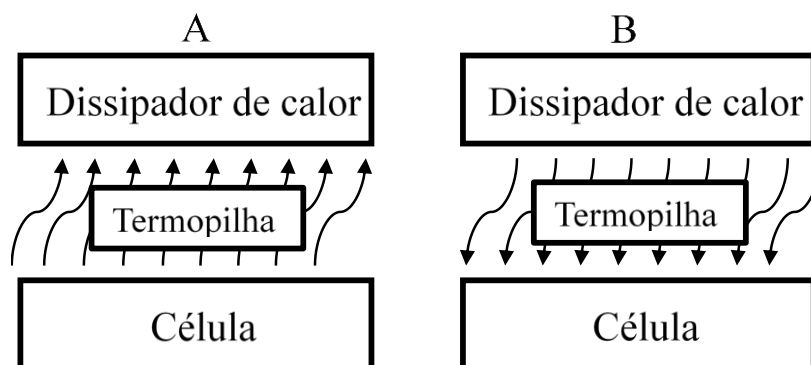


Figura 1. Esquema representativo da transferência de calor entre uma célula calorimétrica (ou referência) e um dissipador de calor num processo exotérmico (A) ou endotérmico (B) e da sua deteção por termopilhas.

por exemplo, todo o sistema ter que estar rigorosamente à mesma temperatura, sendo necessário equilibrar o sistema durante pelo menos uma hora (Braissant *et al.*, 2010a). Outro exemplo, associado aos vários tipos de calorimetria, é o de se medir um sinal não-específico (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a), ou seja, deteta-se o fluxo de calor global associado a todos os processos químicos e físicos, exo ou endotérmicos, que ocorram na amostra em estudo. Deste modo, a ocorrência de fenómenos desconhecidos afeta o sinal do calorímetro (Braissant *et al.*, 2010a). Assim, a aplicação desta técnica com sucesso exige um planeamento experimental muito cuidadoso, complexo e demorado (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a), especialmente quando o objetivo é a sua aplicação ao estudo do metabolismo de microrganismos devido à sua complexidade (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978). A ocorrência de vários processos em simultâneo torna o tratamento dos resultados obtidos por calorimetria difícil e exigente (Braissant *et al.*, 2010). Quanto mais processos ocorrerem na amostra analisada, maior é a dificuldade associada ao tratamento dos resultados obtidos, o que torna a análise de fenómenos específicos do metabolismo celular muito complicada.

1.3 Aplicação da calorimetria ao estudo do crescimento de microrganismos

Neste trabalho, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* como modelo experimental. Este microrganismo é um fungo unicelular da classe *Ascomycete*, com uma forma ovóide de aproximadamente 10 µm de comprimento. Apesar de se tratar de um organismo eucariota com as características celulares básicas das células eucariotas mais evoluídas a nível estrutural e funcional, apresenta também algumas características das bactérias, nomeadamente, o facto de ter um crescimento fácil e rápido em qualquer tipo de meio nutritivo, líquido ou sólido, e de com nutrientes suficientes conseguir duplicar a sua população em menos de 2 h (Gralla, 1997).

O genoma da *S. cerevisiae* é de pequenas dimensões e encontra-se completamente sequenciado. Deste modo, células de *S. cerevisiae* podem ser facilmente manipuladas genética (Ikner & Shiozaki, 2005, Godon *et al.*, 1998) e fisiologicamente (Jamieson, 1998), através da construção de mutantes e manipulação das condições de crescimento, respetivamente.

Este microrganismo é um modelo bem conhecido para o estudo da adaptação ao *stress* oxidativo (Jamieson, 1998) e tem os mesmos mecanismos de defesa contra espécies reativas de oxigénio (EROs) que as células eucariotas superiores (Flattery-O'Brien *et al.*, 1993, Jamieson, 1992).

Assim, as células de *S. cerevisiae* são um bom sistema experimental para modelar células eucariotas superiores, permitindo, por exemplo, estudar o metabolismo de células eucariotas com uma proliferação rápida, como as cancerosas (devido às semelhanças metabólicas existentes) (Diaz-Ruiz *et al.*, 2009), e perceber como é que as células eucariotas são afetadas e respondem ao *stress* oxidativo (Ikner & Shiozaki, 2005).

1.3.1 Caracterização metabólica do crescimento da *S. cerevisiae*

O crescimento de microrganismos, como a *S. cerevisiae*, em meio líquido, em condições aeróbias, em *batch* e com a glucose como fonte principal de carbono e energia tem um perfil típico constituído por quatro fases distintas (Váchová *et al.*, 2012, Longo *et al.*, 1996, Werner-Washburne *et al.*, 1996), tal como representado na figura 2. As fases mencionadas são a lag, exponencial, pós-diáuxica e estacionária. Cada uma delas tem um conjunto de características ao nível do metabolismo e morfologia celulares que as distinguem das outras. O estudo do crescimento e metabolismo celulares é essencial, uma vez que a sua desregulação está na origem de várias doenças, por exemplo, cancro (Slavov *et al.*, 2014).

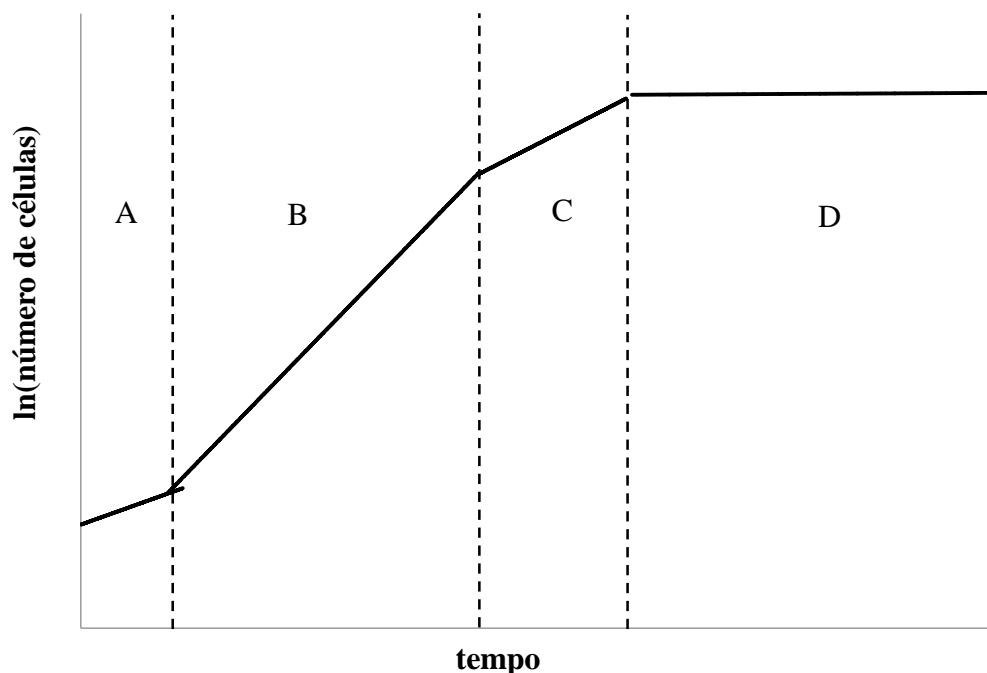


Figura 2. Esquema representativo de uma curva de crescimento típica. As letras A, B, C e D representam as fases lag, exponencial, pós-diáuxica e estacionária, respectivamente.

1.3.1.1 Fase lag

A primeira fase, conhecida por fase lag (região A da figura 2), é a menos estudada de todas as fases de crescimento (Rolfe *et al.*, 2012). É caracterizada por ser uma fase de adaptação das células ao meio de cultura (Váchová *et al.*, 2012, Higuera-Guisset *et al.*, 2005). Apesar da alta atividade metabólica associada a este processo de adaptação, está associada a um baixo direcionamento do metabolismo para o ciclo de divisão celular, tendo por isso uma taxa de crescimento reduzida (Schiraldi, 1995). Por estar associada a uma divisão celular baixa, durante muito tempo, foi vista como uma fase dormente (Rolfe *et al.*, 2012). No entanto, esta ideia está a ser ultrapassada e já se dá maior importância à sua atividade metabólica. Assim, vários estudos tratam a fase lag como muito ativa

metabolicamente graças ao enorme ajuste metabólico a que está associada (Rolfe *et al.*, 2012, Schiraldi, 1995).

Como já se mencionou, este ajuste metabólico é necessário para que as culturas se adaptem completamente ao meio em que se encontram, e envolve a produção dos componentes celulares necessários (ex: enzimas) ao consumo dos nutrientes presentes no meio (Lamprecht, 2003, Rolfe *et al.*, 2012). Além disso, há também atividades anabólica e catabólica intensas para a produção de biomassa e energia, respetivamente, ambas necessárias para a rápida proliferação celular associada à fase seguinte (Schiraldi, 1995, Lamprecht, 2003, Rolfe *et al.*, 2012, Brejning *et al.*, 2005, Brejning *et al.*, 2003). Há várias evidências que suportam esta afirmação, por exemplo, em procariotas, observou-se um aumento da transcrição de genes envolvidos na síntese proteica (ex: biogénese de ribossomas), de nucleótidos e de lípidos, na transcrição, na glicólise e na respiração aeróbia (Rolfe *et al.*, 2012). Em *S. cerevisiae* também já se observou um aumento da transcrição destes grupos genes e de outros como, por exemplo, os envolvidos no *folding* proteico, no processamento do RNA, entre outros (Brejning *et al.*, 2005, Brejning *et al.*, 2003).

1.3.1.2 Fase exponencial

A fase seguinte, denominada por fase exponencial (região B da figura 2), é caracterizada por ter um crescimento celular muito rápido (Váchová *et al.*, 2012, Longo *et al.*, 1996, Werner-Washburne *et al.*, 1996). Esta é a fase com maior taxa de crescimento (taxa de divisão celular) (Váchová *et al.*, 2012), o que se deve ao facto das células estarem totalmente adaptadas ao meio em que se encontram e deste ter o seu conteúdo nutritivo quase completo.

Durante muito tempo, pensou-se que o metabolismo associado à fase exponencial estava num estado estático, uma vez que a sua taxa de crescimento é constante (Slavov *et al.*, 2014). O metabolismo catalítico desta fase depende da fermentação da glucose e respiração aeróbia em paralelo, com predominância da fermentação (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2005). No entanto, a partir de um certo momento, o consumo de O₂ decresce (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2005), tal como a produção de ATP (trifosfato de adenosina) por célula (Slavov *et al.*, 2014) e a resistência a *stress* térmico e oxidativo (Slavov *et al.*, 2014). Assim, percebe-se que apesar da taxa de crescimento da fase exponencial ser constante, esta é altamente dinâmica em termos do seu metabolismo (Slavov *et al.*, 2014). Portanto, como seria de prever, o proteoma, transcriptoma e o padrão de modificações pós-traducionais estão em constante remodelação no seu decurso. Por exemplo, observa-se uma redução da transcrição e tradução de alguns dos genes mais importantes para a respiração à medida que esta diminui, por exemplo, alguns genes de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e de genes associados à síntese de NADPH (Slavov *et al.*, 2014).

1.3.1.3 Fase pós-diáuxica

A fase exponencial termina quando a fonte de carbono inicial (glucose) se esgota. Nesse momento dá-se a transição diáuxica (fronteira entre B e C da figura 2) e inicia-se a fase pós-diáuxica (região C), onde decorre uma readaptação metabólica para o consumo de uma nova fonte de carbono, que consiste no etanol acumulado na fase exponencial (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2005, Larsson *et al.*, 1993). O consumo do etanol é feito através de um metabolismo respiratório, que se torna predominante sobre a glicólise (Brauer *et al.*, 2005, Lamprecht, 2003). Esta fase é caracterizada por várias modificações morfológicas e fisiológicas na célula, bem como por uma diminuição da taxa de

crescimento devido ao esgotamento da fonte de carbono preferencial e uso de uma alternativa (Váchová *et al.*, 2012, Brauer *et al.*, 2005) associada a uma menor velocidade de produção de energia (Brauer *et al.*, 2005). Este fenómeno é observado sempre que há uma transição de uma fonte de carbono preferencial para outra secundária que seja metabolizada por um sistema enzimático diferente (Váchová *et al.*, 2012, Schaarschmidt & Lamprecht, 1978), seja uma transição glucose-etanol ou não.

A readaptação metabólica desta fase envolve uma reprogramação metabólica global extensa (Haurie *et al.*, 2001) com um grande impacto no proteoma e transcriptoma celulares (Brauer *et al.*, 2005). Dada a transição para um metabolismo mais focado na respiração, observa-se, por exemplo, uma redução da transcrição e tradução dos genes da glicólise (Brauer *et al.*, 2005), aumento dos genes da respiração (Brauer *et al.*, 2005) e uma ativação da resposta global a *stress* oxidativo uma vez que a produção intracelular de EROs aumenta (Gasch *et al.*, 2000, Brauer *et al.*, 2005). Além disso, Brauer *et al.* observaram que genes associados à produção de aminoácidos e nucleótidos são estimulados (estudaram apenas os níveis de mRNA) (Brauer *et al.*, 2005), o que é concordante com a alteração global do padrão de tradução e transcrição que ocorre nesta fase.

1.3.1.4 Fase estacionária

A última fase de crescimento, conhecida por fase estacionária (região D da figura 2), inicia-se quando o conteúdo nutritivo do meio se esgota e está associada a uma redução significativa ou mesmo a um cessar da divisão celular (Váchová *et al.*, 2012, Gralla, 1997). Esta fase é acompanhada por uma grande redução da taxa metabólica (Gralla, 1997), que afeta tanto a síntese de mRNAs como de proteínas (Werner-Washburne *et al.*, 1996). No entanto observa-se uma indução de, por exemplo, genes envolvidos na resposta

a *stresses* como o oxidativo (Izawa *et al.*, 1996). Assim, nem mesmo a fase estacionária está associada a uma atividade metabólica nula, até porque as células permanecem vivas nesta fase.

1.3.2 Termodinâmica do crescimento da *S. cerevisiae*

Durante o crescimento de microrganismos ocorre uma série de processos químicos e físicos que são acompanhados pela libertação ou consumo de calor. Desta forma, medir o fluxo de calor associado a estes processos é uma forma adequada de analisar o metabolismo celular durante o crescimento (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Larsson *et al.*, 1993, Li *et al.*, 1999). A aplicação da calorimetria ao estudo do crescimento de microrganismos permite detetar fenómenos biológicos específicos (ex: transição diáuxica) na curva *P-t*, bem como alterações devidas a modificações na composição do meio ou à introdução de outros estímulos (ex: antibióticos) (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978, Li *et al.*, 1999, Schaarshmidt & Lamprecht, 1976).

O crescimento de culturas líquidas de *S. cerevisiae*, assim como de outros microrganismos (ex: *E. coli*), acompanhado por calorimetria com a glucose como fonte principal de carbono e energia, em condições aeróbias e em *batch* é um assunto bastante estudado (Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972, Higuera-Guisset *et al.*, 2005). A curva *P-t* típica (potência dissipada pela população celular *vs* tempo), descrita na figura 3, contém quatro fases, tal como uma curva de crescimento seguida pelos métodos tradicionais (ex: densidade ótica). Inicialmente, deteta-se uma baixa potência dissipada pela cultura, o que está associado à fase lag (região A) (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978, Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972). De seguida, observa-se um aumento muito rápido da potência dissipada durante a fase exponencial (região B) (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978, Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972). Posteriormente, a potência dissipada atinge um

máximo, que se pensa ocorrer no momento da transição entre a fase exponencial e a pós-diáuxica (fronteira entre B e C) (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978, Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972). Há uma redução da potência dissipada durante um período de tempo curto, que se pensa estar associada à remodelação metabólica que acompanha a transição diáuxica (Braissant *et al.*, 2013, Braissant *et al.*, 2010, Schaarschmidt & Lamprecht, 1978). A potência dissipada volta a aumentar de forma rápida mas a um ritmo menor que na fase exponencial, o que consiste na fase pós-diáuxica (região C) (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978, Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972). Este comportamento bifásico da curva *P-t*, resultante da transição do consumo da glucose para o etanol nas condições mencionadas, é observado sempre que há transição de uma fonte de carbono preferencial para outra secundária que seja metabolizada por um sistema enzimático diferente (Braissant *et al.*, 2013, Schaarschmidt & Lamprecht, 1978), seja glucose-etanol ou não. A potência dissipada atinge novamente um máximo e inicia-se uma redução repentina até se atingir uma linha de base relativamente estável, o que está associado ao início da fase estacionária (região D) (Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972). A potência dissipada na fase estacionária é superior à da lag porque, apesar da fase lag ser muito mais ativa que a estacionária, em termos do seu metabolismo, o número de células na fase estacionária é suficiente para compensar a sua menor atividade metabólica. Esta observação revela que, na fase estacionária, as células permanecem com alguma atividade metabólica, tal como já foi mencionado (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Schiraldi, 1995). O termograma obtido para outros microrganismos é semelhante, por exemplo, para *E. coli* (Higuera-Guisset *et al.*, 2005). Quando o crescimento é anaeróbio, o termograma obtido perde o seu comportamento bifásico, uma vez que a fase estacionária ocorre quando a glucose se esgota porque o etanol acumulado não pode ser metabolizado pela respiração aeróbia

(Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Roy & Samson, 1988), ou seja, porque não existe uma transição diáuxica.

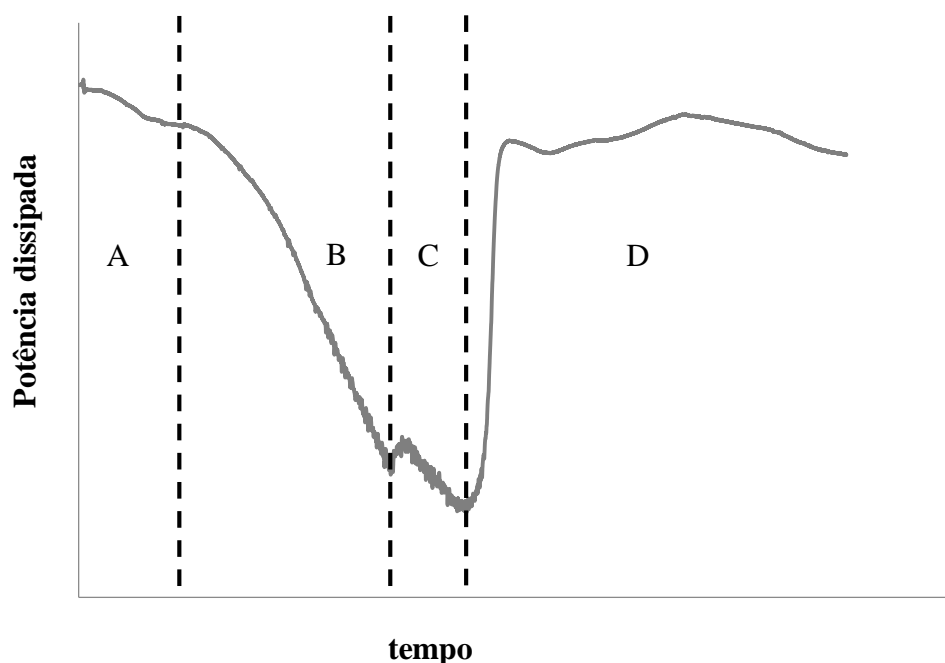


Figura 3. Esquema representativo de uma curva $P-t$ associada ao crescimento de microrganismos típica. As letras A, B, C e D representam as fases lag, exponencial, pós-diáuxica e estacionária, respetivamente.

1.4 *S. cerevisiae* e a sua relação com o H_2O_2

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é uma molécula ubíqua presente em todos os organismos com metabolismo respiratório (Marinho *et al.*, 2014). Esta molécula é a ERO mais abundante *in vivo* e está a ser continuamente produzida intracelularmente como subproduto da respiração aeróbia em conjunto com outras e extracelularmente durante os processos inflamatórios nos organismos superiores (Chance *et al.*, 1979, Temple *et al.*, 2005). Este oxidante pode funcionar como uma fonte de *stress* a concentrações altas ou como sinalizador a doses mais baixas (Marinho *et al.*, 2014).

1.4.1 H₂O₂ e outras espécies reativas de oxigénio como moléculas sinalizadoras e fontes de *stress*

O *stress* oxidativo ocorre quando há uma perturbação no quociente entre [oxidantes] e [antioxidantes] (mecanismos de defesa antioxidante) favorável aos oxidantes. Assim, quando as EROs atingem um nível suficiente para causar *stress* oxidativo, são capazes de oxidar componentes celulares podendo comprometer a estabilidade celular (Marinho *et al.*, 2014, Temple *et al.*, 2005, Izawa *et al.*, 1996). Devido a esta atividade, o H₂O₂ e outras EROs estão na origem de várias doenças, por exemplo, cardiovasculares e doenças associadas ao envelhecimento (Leopold & Loscalzo, 2005, Temple *et al.*, 2005, Izawa *et al.*, 1996, Ikner & Shiozaki, 2005). Como uma forma de proteção, a maior parte dos organismos (ex: *S. cerevisiae*) tem a capacidade de reagir contra este e outros tipos de *stress* (ex: térmico) através de mecanismos de defesa comuns (Temple *et al.*, 2005, Zakrzewska *et al.*, 2011) (razão pela qual a exposição celular a um *stress*, como o térmico, é capaz de aumentar a resistência a outro, como o oxidativo), específicos consoante a natureza do *stress* (Temple *et al.*, 2005 Zakrzewska *et al.*, 2011) e ainda mais particulares para o seu causador (ex: H₂O₂ e anião superóxido geram respostas diferentes apesar de serem ambas contra o *stress* oxidativo) (Ikner and Shiozaki, 2005, Temple *et al.*, 2005, Zakrzewska *et al.*, 2011). Na resposta ao *stress* oxidativo, existem vários antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos para converter as EROs em formas menos reativas, reduzindo assim o risco de oxidação dos componentes celulares que podem ser afetados (Leopold & Loscalzo, 2005, Izawa *et al.*, 1996, Ikner & Shiozaki, 2005). Os catalases e vários peroxidases (ex: citocromo c peroxidases e glutathione peroxidases) parecem ser alguns dos enzimas antioxidantes com um papel importante contra o *stress* oxidativo em *S. cerevisiae*, nomeadamente, em relação ao causado pelo H₂O₂ (Cyrne *et al.*, 2010, Minard & McAlister-Henn, 2001). O glutathione reduzido (GSH)

é um elemento essencial na resposta antioxidante, atuando como cofator de várias enzimas (Leopold & Loscalzo, 2005, Izawa *et al.*, 1996, Dormer *et al.*, 2002). A existência de sistemas de reparação tem um papel fundamental na resistência ao *stress* oxidativo, uma vez que permite reverter os danos causados até um certo ponto (Temple *et al.*, 2005, Ikner & Shiozaki, 2005). No entanto, é essencial salientar que a resposta das células quando sujeitas a *stress* oxidativo não envolve apenas os mecanismos anteriormente referidos, mas uma resposta global que afeta vários processos celulares e tem um impacto grande no proteoma, transcriptoma e no padrão de modificações pós-traducionais celular. Esta resposta desenvolvida pela *S. cerevisiae* é dependente da magnitude do *stress*, ou seja, a resposta depende da oxidação de uma série de proteínas-chave e, intensidades de *stress* diferentes vão afetar conjuntos de proteínas diferentes, o que vai despoletar respostas diferentes (Temple *et al.*, 2005, Godon *et al.*, 1998). Assim, o perfil de ativação/inibição de genes depende da concentração e natureza dos EROs causadores de *stress*. A capacidade de resistência e resposta da *S. cerevisiae* ao *stress* oxidativo altera-se consoante a fase de crescimento (diferentes tipos de metabolismo alteram a exposição celular a *stresses*, por exemplo, o metabolismo respiratório é muito mais importante na fase estacionária ou pós-diáuxica que na exponencial) (Cyrne *et al.*, 2010, Izawa *et al.*, 1996) e ao longo da mesma fase, uma vez que já se observou que a resistência ao H₂O₂ decresce ao longo da fase exponencial (Slavov *et al.*, 2014).

Como já foi mencionado, apesar do H₂O₂, assim como outras EROs, estarem muito associadas ao *stress* oxidativo, já é conhecido que atuam como sinalizadores em vários organismos quando sob certas condições (Marinho *et al.*, 2014, Leopold & Loscalzo, 2005, Forman *et al.*, 2010). Aliás, o número de estudos focados nos processos de sinalização de EROs está a aumentar investigando-se as vias em que participam, como atuam e como afetam a expressão génica (Forman *et al.*, 2010). O H₂O₂ como molécula

senalizadora é produzido de forma intencional e altamente regulada (Marinho *et al.*, 2014). A sua capacidade de levar a diferentes tipos de resposta como sinalizador depende da concentração, localização intra (em organismos compartimentalizados) ou extracelular e tempo de permanência no local (depende de um compromisso entre a cinética de remoção e a cinética de interação com os efetores) (Leopold & Loscalzo, 2005, Forman *et al.*, 2010). Este conjunto de fatores determina os sensores que detetam e interagem com o H₂O₂ definindo, consequentemente, as vias celulares afetadas (Marinho *et al.*, 2014). Este tipo de atividade sinalizadora é conhecida em procariotas (ex: bactérias), eucariotas inferiores (ex: leveduras) e eucariotas superiores (ex: células de mamíferos) (Marinho *et al.*, 2014). É também sabido que o H₂O₂ tem um papel importante na cicatrização acumulando-se na zona lesada e medeando o recrutamento de vários leucócitos (Yoo *et al.*, 2011). Tem para além disso vários outros efeitos como a estimulação da atividade da insulina (Mahadev *et al.*, 2001) e da proliferação celular (Burdon *et al.*, 1989).

1.4.2 Resposta adaptativa da *S. cerevisiae* ao H₂O₂

A *S. cerevisiae* tem a capacidade de desenvolver uma resposta adaptativa ao H₂O₂, tendo-se observado que o seu pré-tratamento com doses sub-letais deste oxidante aumenta sua taxa de sobrevivência quando exposta a doses letais (Temple *et al.*, 2005). A maior resistência celular deve-se ao facto de haver uma ativação prévia de vários mecanismos celulares de resposta ao H₂O₂ durante a adaptação, aumentando a capacidade de resposta e resistência celular quando exposta a adições subsequentes de doses letais (Temple *et al.*, 2005). Já se observou que a exposição de células de *S. cerevisiae* no início da fase exponencial a uma dose sub-letal constante de 150 µM durante 15, 30 e 90 min é capaz de induzir uma resposta adaptativa (Folmer *et al.*, 2008). Mais recentemente, observou-se

também que uma adição bolus de 150 μM no início da fase exponencial também induz esta resposta adaptativa (Zakrzewska *et al.*, 2011).

Godon *et al.* avaliaram o efeito da exposição de células de *S. cerevisiae* no início da fase exponencial a adições bolus de H_2O_2 (400 μM) sobre o proteoma celular e confirmaram as suas observações por análise da transcrição de alguns genes (200 μM) (Godon *et al.*, 1998). Possivelmente, estas adições de H_2O_2 induzem uma resposta adaptativa do género da observada por Zakrzewska *et al.*, uma vez que, como foi mencionado, uma adição bolus de 150 μM é suficiente para induzir a adaptação (Zakrzewska *et al.*, 2011). Estes autores observaram um aumento da atividade antioxidante (ex: aumento da expressão do catalase citosólico e do citocromo c peroxidase) (Godon *et al.*, 1998). Proteínas associadas a uma resposta mais comum ao *stress* como as HSPs (*heat shock proteins*), de proteases e componentes do proteassoma também foram mais expressas (Godon *et al.*, 1998). Pensa-se que isto ocorre para auxiliar o *folding* correto de proteínas oxidadas ou a sua degradação quando demasiado danificadas e para efetuar a remodelação do proteoma que ocorre nesta situação de *stress* (Godon *et al.*, 1998). Observaram também uma remodelação do conjunto de proteínas envolvido no metabolismo catabólico, que favorece a formação de NADPH em detrimento da glicólise, sugerindo um desvio do consumo de glucose pela via fermentativa para a via dos fosfatos de pentose (Godon *et al.*, 1998). Além disso, a biossíntese de nucleótidos e proteínas também parece ser reduzida (Godon *et al.*, 1998). Desta forma, parece ocorrer um desinvestimento no ciclo de divisão celular e produção de biomassa e um redirecionamento de recursos para a resposta ao *stress* oxidativo (Godon *et al.*, 1998). Zakrzewska *et al.* observaram que a redução da taxa de crescimento da *S. cerevisiae* faz parte da resposta contra vários *stresses* severos como o oxidativo (Zakrzewska *et al.*, 2011), o que é concordante com esta visão de que a resposta a *stresses* exige um desvio

de energia e outros recursos para a remodelação metabólica necessária para a sobrevivência nestas condições. Este compromisso entre o crescimento celular e a resistência a *stress* parece ser globalmente aceite (Godon *et al.*, 1998, Zakrzewska *et al.*, 2011).

Durante a adaptação induzida pelo estado estacionário de H₂O₂, há uma modificação da composição membranar, que altera as suas características biofísicas e a torna mais impermeável ao H₂O₂ (Branco *et al.*, 2004, Folmer *et al.*, 2008, Pedroso *et al.*, 2012, Pedroso *et al.*, 2009). Assim, observou-se que células de *S.cerevisiae* não-adaptadas e adaptadas durante 15 e 90 min têm diferentes razões de concentração extracelular e intracelular de H₂O₂, mas igual consumo deste oxidante (Branco *et al.*, 2004), o que revela que a membrana é modificada de uma forma continua ao longo do processo de adaptação (Branco *et al.*, 2004, Folmer *et al.*, 2008). Deste modo, células adaptadas e não-adaptadas expostas a uma igual concentração extracelular deste oxidante vão estar sujeitas a diferentes concentrações internas (Branco *et al.*, 2004, Folmer *et al.*, 2008). Este fenómeno é acompanhado por alterações ao nível da expressão génica e do proteoma celular (Pedroso *et al.*, 2012). Neste caso, regra geral, o conjunto de processos celulares com proteínas diferencialmente expressas parece ser semelhante ao observado por Godon *et al.*, referido anteriormente.

Pode assim concluir-se que a resposta ao *stress* oxidativo, nomeadamente ao causado por adições bolus e de doses estacionárias de H₂O₂, consiste numa resposta global (pensa-se que mais de 10 % dos genes da *S. cerevisiae* tem um papel na resistência ao *stress* oxidativo (Winzeler *et al.*, 1999)), transiente e dependente de modificações em vários parâmetros celulares como a eficiência de tradução proteica, a velocidade de transcrição e tradução, a velocidade de degradação proteica e de mRNAs, entre outros (Pedroso *et al.*, 2012). Desta forma, tem um alto impacto sobre o transcriptoma, proteoma

e padrão de modificações pós-traducionais celular (Godon *et al.*, 1998, Pedroso *et al.*, 2012), afetando a resistência ao H_2O_2 por vários mecanismos diferentes. Em *S. cerevisiae*, esta modificação global reflete-se na capacidade de degradação de EROs, no ciclo de divisão celular, no metabolismo catabólico e anabólico, na composição membranar, entre outros (Cyrne *et al.*, 2003, Cyrne *et al.*, 2010, Dormer *et al.*, 2002, Matias *et al.*, 2007, Pedroso *et al.*, 2009, Godon *et al.*, 1998, Pedroso *et al.*, 2012, Folmer *et al.*, 2007, Branco *et al.*, 2004, Zakrzewska *et al.*, 2011). O modo como a adaptação ocorre é um campo de estudo interessante e ainda com muito por conhecer (Temple *et al.*, 2005).

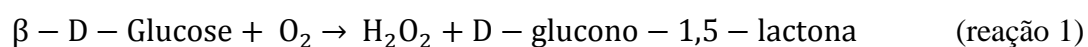
1.4.3 Estudos do H_2O_2 com adições bolus vs estado estacionário

Para estudar os efeitos celulares do H_2O_2 há várias formas alternativas de expor as células a este estímulo. Duas das formas são: adições bolus e em estado estacionário. Estes procedimentos de exposição celular diferem na forma como o H_2O_2 é adicionado ao meio de cultura celular e produzem efeitos diferentes (Marinho *et al.*, 2013a).

O método das adições bolus consiste em fazer adições momentâneas da concentração de H_2O_2 desejada ao meio de cultura (Marinho *et al.*, 2013a). Esta é a forma mais simples de estudar o efeito deste oxidante, mas, no entanto, é também a menos reprodutível uma vez que é muito variável com as condições experimentais (Marinho *et al.*, 2013a). A baixa reprodutibilidade associada a este método é explicada pelo facto de alguns fatores serem muitas vezes negligenciados como a densidade celular a que as adições ocorrem (Marinho *et al.*, 2013a) (a concentração de H_2O_2 no meio pode ser igual, mas em termos de moléculas por célula pode ser completamente diferente), a modificação contínua da resistência celular a este oxidante ao longo da fase exponencial (em *S. cerevisiae*) (Slavov *et al.*, 2014) ou a variação da velocidade de consumo entre diferentes tipos de células (a concentração inicial a que estão expostas é igual, mas passado um

tempo t já não, pelo que os resultados podem não ser comparáveis). Este método é mais adequado para o estudo do H_2O_2 como fonte de *stress* oxidativo e não tanto como sinalizador porque, devido ao seu consumo rápido pela célula, geralmente tem que ser adicionado em doses altas para se observarem efeitos biológicos (Marinho *et al.*, 2013a).

O método da adição em estado estacionário consiste em adicionar uma quantidade de H_2O_2 correspondente à concentração inicial pretendida utilizando em seguida um método capaz de assegurar a manutenção de uma concentração estacionária (Marinho *et al.*, 2013a). Para aplicar este procedimento, é necessário conhecer a velocidade a que as células consomem H_2O_2 nas condições experimentais pretendidas, e garantir que a regeneração ocorre à mesma velocidade (Marinho *et al.*, 2013a). O processo até agora utilizado envolve o uso do aminoácido oxidase (Sousa-Lopes, 2004), ou, mais frequentemente, do glucose oxidase (GO) que catalisa a reação descrita abaixo.



Neste trabalho usou-se uma técnica diferente: em vez de se utilizar o GO ou outro enzima gerador de H_2O_2 , utilizou-se uma bureta controlada computacionalmente de maneira a fazer adições sequenciais minuto a minuto como forma de regeneração do H_2O_2 consumido. Tanto este método como o tradicional envolvem uma monitorização da concentração de H_2O_2 ao longo da experiência para efetuar as correções necessárias quando a concentração real é diferente da pretendida (Marinho *et al.*, 2013a). Os métodos de estado estacionário são muito mais reprodutíveis do que os baseados em adições bolus porque as células estão expostas sempre à mesma concentração de H_2O_2 ao longo de toda a experiência, mesmo que o consumam a velocidades diferentes (Marinho *et al.*, 2013a). Além disso, ao expor as células a uma dose estacionária de H_2O_2 durante períodos de tempo longos pode-se testar o efeito deste oxidante a doses mais baixas, uma vez que estas se vão manter constantes durante a incubação. Este novo método com a bureta foi utilizado

pela primeira vez neste trabalho e está descrito mais pormenorizadamente na secção 2.7.1. Permite evitar algumas desvantagens associadas do uso de enzimas como, por exemplo, o consumo extra de glucose associado à reação catalisada pelo GO (Marinho *et al.*, 2013a) ou o facto de ser necessário ter em conta o calor resultante da atividade enzimática no sinal calorimétrico medido. Além disso, pode-se regular o volume de H₂O₂ adicionado caso se esteja a obter uma concentração maior ou menor que a pretendida, enquanto que com o método tradicional só se pode corrigir concentrações inferiores à pretendida (Marinho *et al.*, 2013a).

Já se observou que a adição bolus ou estacionária de H₂O₂ ou, de outras substâncias, produz resultados diferentes (Doskey *et al.*, 2015, de Oliveira-Marques *et al.*, 2007, Matias *et al.*, 2011). Por exemplo, Doskey *et al.* notaram que a adição sequencial de várias doses de 1,4-benzoquinona causa um dano menor sobre a membrana celular que uma única adição bolus. Noutro exemplo, Matias *et al.* observaram que células de *S. cerevisiae* no início da fase exponencial expostas a adições de 100 ou 150 µM de H₂O₂ em estado estacionário apresentam uma diminuição da atividade do sintase de ácidos gordos. Já adições bolus das mesmas doses não afetam a atividade do enzima.

Doskey *et al.* propuseram um novo método de doseamento em experiências onde se testa o efeito de uma determinada substância sobre uma população celular (Doskey *et al.*, 2015). Este método consiste em referir a concentração da substância em mole/massa por célula em vez de mole/massa por volume de meio (Doskey *et al.*, 2015). Um problema comum da métrica tradicional consiste no uso de diferentes densidades celulares, mas da mesma concentração de substância em estudo em relação ao volume de meio (Doskey *et al.*, 2015). Assim, os autores preveem e comprovam que, pelo menos nalguns casos, este método de doseamento permite obter uma maior reprodutibilidade, facilita a comparação de resultados entre tipos de células diferentes e é muito mais informativo (Doskey *et al.*,

2015). Neste trabalho, usam-se os dois métodos de doseamento mencionados para facilitar a replicação dos resultados obtidos.

1.5 Objetivos

Um dos objetivos atuais da Biologia e Bioquímica é executar uma análise metabólica global e integrativa e não, apenas, de pequenas porções do metabolismo. Já tem havido vários estudos a tender neste sentido (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2008, Brauer *et al.*, 2005). A calorimetria é uma excelente ferramenta para este tipo de análise, uma vez que deteta um fluxo de calor associado a todos os processos celulares em simultâneo.

A calorimetria já é aplicada para estudar a resposta celular a estímulos externos (ex: antibióticos) com sucesso (Braissant *et al.*, 2010, Braissant *et al.*, 2010a, Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Garedew *et al.*, 2004, Lamprecht, 2003, Braissant *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2000), no entanto, apenas recentemente, e no nosso grupo de investigação, se iniciou a sua aplicação ao estudo dos efeitos do H₂O₂ sobre o metabolismo celular (Semedo, 2014). O conhecimento acerca deste assunto encontra-se numa fase muito precoce e espera-se que este trabalho tenha uma contribuição significativa para o seu aumento.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

1. Medir a potência dissipada por célula ao longo da curva de crescimento da *S. cerevisiae*.

Até agora, assumiu-se que cada fase de crescimento tem uma potência dissipada por célula constante (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Braissant *et al.*, 2013, Hashimoto & Takashi, 1982), apesar de ser previsível e já haver indícios de que esta varie ao longo do tempo (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2009). Deste modo, procedeu-se à normalização da potência dissipada pelo número de células ao longo de toda a curva de

crescimento, permitindo uma análise mais profunda do metabolismo celular, que apenas pela potência dissipada pela população celular.

2. Implementar pela primeira vez um sistema de incubação para doses estacionárias de H_2O_2 independente da adição de enzimas.

Até este momento, para se obter uma dose estacionária de H_2O_2 utilizaram-se enzimas geradores deste oxidante como o GO ou o aminoácido oxidase. Este procedimento está associado a algumas desvantagens já enunciadas como o facto destes enzimas poderem interferir no sistema em estudo (Marinho *et al.*, 2013a) ou o de ser necessário ter a entalpia das reações que catalisam em conta caso se utilizem em estudos calorimétricos. O sistema descrito e utilizado neste trabalho evita os problemas associados ao uso de enzimas geradores de H_2O_2 porque se baseia no uso de uma bureta controlada computacionalmente de maneira a fazer adições sequenciais minuto a minuto como forma de regeneração do H_2O_2 consumido.

3. Comparar a resposta metabólica/termodinâmica da *S. cerevisiae* a doses estacionárias e bolus de H_2O_2

Muitas vezes, em estudos de calorimetria aplicada ao crescimento de microrganismos determina-se a área do termograma ou de zonas específicas e a potência dissipada máxima (Lamprecht *et al.*, 1976). Estes parâmetros permitem tirar ilações acerca do metabolismo celular, no entanto, regra geral, quando se utiliza a calorimetria para estudar o efeito de *stresses* causados pela adição de substâncias exógenas (ex: antibióticos) raramente são determinados e avalia-se apenas o efeito sobre o sinal calorimétrico no momento da exposição (se aumenta ou diminui). Neste trabalho, avaliou-se tanto o impacto imediato do H_2O_2 sobre o metabolismo celular (efeito sobre o sinal)

como o efeito a longo prazo (determinação do calor libertado entre certos períodos de crescimento pela integração de secções da curva $P-t$).

Relativamente aos objetivos 1 e 3 foi necessário dar um grande ênfase ao tratamento quantitativo dos dados calorimétricos. O aumento do foco nesta tarefa, em relação a outros trabalhos do género, permitiu realizar uma análise muito mais profunda sobre o metabolismo celular na ausência e presença do *stress* oxidativo induzido pelo H₂O₂. Não seria possível obter esta informação com o tratamento qualitativo típico destes trabalhos.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

O extrato de levedura, a bactopectona, o YNB (*yeast nitrogen base*) e o agar foram obtidos da Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, França. O catalase (EC 1.11.1.6) de fígado bovino utilizado foi da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA. O peróxido de hidrogénio foi proveniente da Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA; Em todas as experiências e testes em que foi utilizado, preparou-se uma solução de 9-10mM (concentração confirmada por medição da absorvência a 240nm) a partir da solução *stock* de 9M. Todos os volumes adicionados às células e em testes foram oriundos da solução de 9-10mM, que foi sempre mantida em gelo e sem exposição à luz.

2.2 Estirpes de levedura, meio e condições de crescimento

Neste trabalho utilizou-se a estirpe haploide BY4741 de *S. cerevisiae* (*wild-type*, genótipo *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*), que foi obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha. Para preparar as culturas utilizadas em todas as experiências, as células de *S. cerevisiae* foram inoculadas a ~ 0,035 OD₆₀₀ a partir de uma pré-cultura em

fase estacionária (crescida durante a noite). O crescimento e todas as incubações foram feitos em meio sintético completo (SC), que contém YNB 6,8 % (m/v) como fonte de azoto, glucose 2 % (m/v) como fonte de carbono e energia (Merck, Darmstadt, Alemanha), arginina 0,0002 % (m/v), metionina 0,002 % (m/v), tirosina 0,003 % (m/v), isoleucina 0,003 % (m/v), lisina 0,003 % (m/v), fenilalanina 0,005 % (m/v), aspartato 0,01 % (m/v), adenina 0,0025 % (m/v), serina 0,04 % (m/v), leucina 0,01 % (m/v), triptofano 0,005 % (m/v), histidina 0,01 % (m/v), treonina 0,02 % (m/v) e uracilo 0,0025 % (m/v) a 30 °C, em condições aeróbias e com agitação a 160 rpm numa incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen ou em agitação vigorosa na incubadora adjacente ao calorímetro (ver secção 2.3). Os aminoácidos e bases mencionados foram obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA. Todas as experiências foram feitas em *batch*. O meio foi preparado, sob condições de assepsia, sempre no dia anterior ao da experiência porque, deste modo, a reprodutibilidade das experiências calorimétricas é maior quando comparada com a obtida utilizando meios mais antigos. Todos os componentes do meio foram previamente esterilizados por autoclavagem a 110 ou 120 °C (dependendo do componente em questão) durante 20 min, para prevenir contaminações. O restante material utilizado também foi esterilizado.

2.3 Equipamento

O equipamento (figura 4) é constituído essencialmente por (i) um microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1 equipado com uma célula “flow-trough” calibrada eletricamente, já descrito anteriormente no modo de mistura (Leskiv *et al.*, 2009); (ii) um reator de vidro com a amostra em estudo (normalmente a cultura de *S. cerevisiae*, mas por vezes apenas água ou meio de cultura, ver abaixo) mantida sob agitação magnética; (iii) uma incubadora adjacente ao calorímetro onde está colocado o

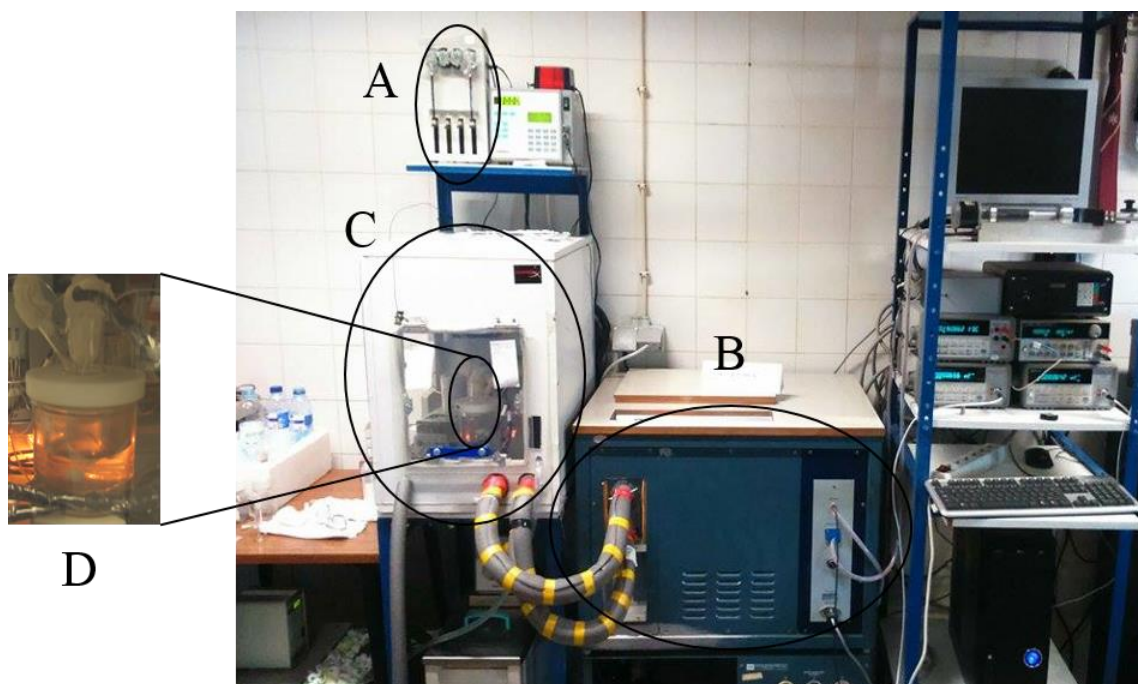


Figura 4. Equipamento utilizado para acompanhar o crescimento e metabolismo celulares por calorimetria. A - bureta automática; B - microcalorímetro de fluxo; C- incubadora D - reator com a amostra em estudo.

reator acima referido juntamente com um balão erlenmeyer com outra cultura destinada a seguir em paralelo a evolução do número de células por medidas de densidade ótica e diverso equipamento auxiliar (ex: bomba peristáltica utilizada para circular o conteúdo do reator através da célula calorimétrica, placas de agitação magnética); (iv) uma bureta automática (Crison Multi-burette 4S) equipada com uma seringa de 1 cm³ (Hamilton) para adição de H₂O₂, com uma precisão melhor do que 0,001 cm³, conforme verificado experimentalmente numa série de testes realizados com água (Gonçalves *et al.*, 2011). A versão original do calorímetro de fluxo LKB foi considerada como muito apropriada para o estudo de microrganismos (Lamprecht, 2003). O controlo da bureta e das condições de calibração elétrica do calorímetro bem como a aquisição de dados foram realizados com o programa CBCAL 1.0 (Bernardes, 2008). Uma vez que se pretendia que os resultados fossem compatíveis com os de experiências anteriores realizadas em condições típicas de ensaios microbiológicos, não foi deliberadamente efetuado um controlo estrito da

atmosfera a que está sujeita a cultura celular. O reator foi selado com um tampão de gaze, de modo a prevenir contaminações por microrganismos, permitindo ao mesmo tempo um arejamento eficiente das células e uma manipulação simples dos tubos de teflon onde a cultura circula entre reator e o calorímetro, ou dos tubos de teflon utilizados para as adições de H_2O_2 a partir da bureta.

Todo o sistema estava termostatizado a 30 °C, incluindo a tubagem onde a cultura circula. O controlo de temperatura é garantido por diferentes crióstatos sendo a estabilidade da temperatura de $\pm 0,01$ °C no reator (Julabo MB unit and HAAKE EK20 immersion cooler), $\pm 0,02$ °C na incubadora (Julabo LC6 controller) e ± 0.008 °C no calorímetro (LKB 10700-1 thermostat). A aparelhagem é, para além disso, mantida numa sala com temperatura controlada a 22 ± 1 °C por um ar condicionado. A termostatização do reator a 30 °C, apesar deste se encontrar numa incubadora mantida a esta temperatura, permite evitar perturbações térmicas causadas pelo abrir/fechar da porta da incubadora quando é necessário manipular a cultura celular ou as tubagens, obtendo-se uma melhor estabilidade do sinal calorimétrico.

O caudal nominal da bomba peristáltica (Ismatec MS-4/12 multi-channel peristaltic pump) que assegura a circulação da amostra entre o reator e o calorímetro foi ajustado de modo a corresponder a um caudal real $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Esse ajuste foi verificado regularmente colocando água no reator e determinando a massa recolhida num balão erlenmeyer durante certo período de tempo. Note-se que variações de caudal podem influenciar significativamente a reprodutibilidade dos resultados pois afetam vários parâmetros calorimétricos como a constante de calibração (Leskiv *et al.*, 2009), o volume efetivo da célula (Leskiv *et al.*, 2009) ou a sensibilidade do sinal (Garedew *et al.*, 2004). Com o caudal referido, a amostra leva dois minutos a percorrer o percurso do reator à célula calorimétrica e outros dois minutos a regressar ao reator.

Efetuuou-se a limpeza e esterilização do sistema depois de cada ensaio com culturas celulares, fazendo circular: (i) uma solução aquosa de lixívia 20 % (v/v) durante pelo menos 4-5 h; (ii) H₂O *millipore* durante 10-20 min; (iii) etanol aquoso 70 % (v/v) durante 20 min; e (iv) H₂O *millipore* por mais 10-20 min.

2.4 Calibração e aquisição de dados

O sinal calorimétrico detetado num dado instante corresponde à diferença de potencial entre as termopilhas associadas à célula *flow-through* (usada para monitorizar as culturas celulares) e à célula referência (neste caso a célula de mistura). Neste trabalho, não se circulou qualquer amostra na célula referência. Este sistema diferencial permite diminuir o efeito no sinal calorimétrico de perturbações (ex pequenas variações de temperatura) que afetam simultaneamente as duas células. Como já foi referido, variações de caudal afetam o sinal obtido. Assim, optou-se por não circular qualquer amostra na célula referência, uma vez que teria que se garantir que o caudal que estava a passar nas duas células era igual em todos os momentos, o que seria praticamente impossível (ex: há variações de caudal ao longo de cada experiência associadas às bombas peristálticas e tubagens utilizadas).

O deslocamento, S , do sinal detetado relativamente à linha de base é proporcional à potência, P , dissipada no interior da célula se o processo em estudo for exotérmico (como no caso do metabolismo celular) ou fornecida à célula pelo termostato se o processo for endotérmico (Leskiv *et al.*, 2009).

$$P = \varepsilon S \tag{1}$$

A constante de proporcionalidade (ε), normalmente designada por constante de calibração, é obtida eletricamente. Uma calibração elétrica corresponde a um ensaio em que se aplica uma diferença de potencial, V , constante a uma resistência fixada na célula

calorimétrica, que é percorrida por uma corrente elétrica de intensidade conhecida, I , durante um certo período de tempo t , gerando um deslocamento médio de sinal S_c em relação à linha de base. A potência, P , dissipada em média por efeito de Joule dentro da célula ao longo desse estado estacionário de duração t é obtida a partir da equação:

$$P = \frac{\sum_i V_i I_i \Delta t_i}{t} \quad (2)$$

onde V_i e I_i correspondem respetivamente à voltagem e corrente medidas num determinado instante t e Δt_i é o intervalo de tempo que separa duas aquisições consecutivas de voltagem e corrente (neste caso 2 s). Quando a calibração dura o suficiente para que o sinal atinja um estado estacionário, a constante de calibração é dada por:

$$\varepsilon = \frac{P}{S_c} \quad (3)$$

Quando o tempo de calibração é demasiado curto para que o sinal obtido atinja um estado estacionário o valor de ε pode ser obtido a partir de:

$$\varepsilon = \frac{VIt}{A_c} \quad (4)$$

em que o termo VIt corresponde ao calor total Q dissipado na calibração ($Q = VIt$) e A_c à área do pico associado à calibração. Uma vez conhecido o valor de ε , a potência libertada num determinado instante ou o calor total envolvido no processo calorimétrico, podem ser calculados por equações análogas às equações 3 e 4.

Para aplicar a calorimetria de fluxo de uma forma quantitativa é necessário conhecer o volume efetivo (V_{efetivo}) da célula calorimétrica. O volume efetivo corresponde ao volume da célula em que há deteção do calor libertado pela amostra em circulação.

Este volume pode ser diferente do volume da célula calorimétrica, sendo tanto menor quanto maior o fluxo da amostra em circulação. O valor $V_{\text{efetivo}} = 0,396 \text{ cm}^3$, correspondente ao fluxo de $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ utilizado nas presentes experiências, tinha sido previamente determinado (Semedo, 2014) com base no estudo cinético da hidrólise do metilparabeno catalisada por hidróxido de sódio, conforme recomendado na literatura (O'Neill *et al.*, 2003)

2.5 Testes ao calorímetro

2.5.1 Determinação da constante de calibração para H₂O, meio e culturas em fase estacionária

Nos vários estudos em que se aplica calorimetria a microbiologia é comum determinar a constante de calibração com H₂O e meio (Higuera-Guisset *et al.*, 2005), no entanto, tanto quanto é do nosso conhecimento, nunca foram efetuadas calibrações com culturas. A constante de calibração depende de vários fatores como da viscosidade da amostra ou do caudal associado à sua circulação (Leskiv *et al.*, 2009). Assim, foi-se determinar a constante de calibração em H₂O, meio e culturas em fase estacionária para perceber se varia consoante o tipo de amostra em análise. Escolheu-se esta fase de crescimento para as calibrações em culturas celulares porque está associada a uma linha de base mais estável e durante um maior período de tempo. Este conjunto de experiências consistiu em colocar 20mL de H₂O, meio ou culturas em fase estacionária em circulação no calorímetro. De seguida, efetuou-se uma série de calibrações elétricas, cuja duração foi dos 20s aos 30min obtendo-se as respetivas constantes de calibração. Estas foram obtidas a partir das equações 3 e 4 quando se atingiu uma linha da base estável durante a calibração (calibrações de 30min) ou apenas pela equação 4 nas calibrações de duração mais curta.

Na figura 5 estão representadas 3 calibrações em H₂O. Antes de efetuar cada uma das calibrações, obteve-se uma linha de base estável e, de seguida, aplicou-se uma diferença de potencial a uma resistência dentro da célula calorimétrica durante um intervalo de tempo conhecido. O calor dissipado pela resistência é detetado e provoca alterações na linha de base (picos assinalados na figura). A partir da área de cada um dos picos assinalados, da intensidade da corrente aplicada, do potencial aplicado e da duração da perturbação calculou-se o ϵ a partir da equação 4.

No quadro 1 estão expressas as médias das constantes de calibração obtidas para H₂O, meio e culturas em fase estacionária. Pode concluir-se desse quadro que a constante de calibração não varia com as amostras analisadas dentro dos intervalos de incerteza. Assim, conclui-se que o mesmo sinal calorimétrico está associado a uma potência dissipada idêntica independentemente do tipo de amostra em circulação (H₂O, meio ou culturas celulares). Determinou-se a média ponderada para estes três tipos de amostra e usou-se este valor de constante de calibração, $15,5 \pm 0,2 \mu\text{W} \cdot \mu\text{V}^{-1}$, para obter a potência dissipada por qualquer tipo de amostra analisada ao longo de todo o trabalho.

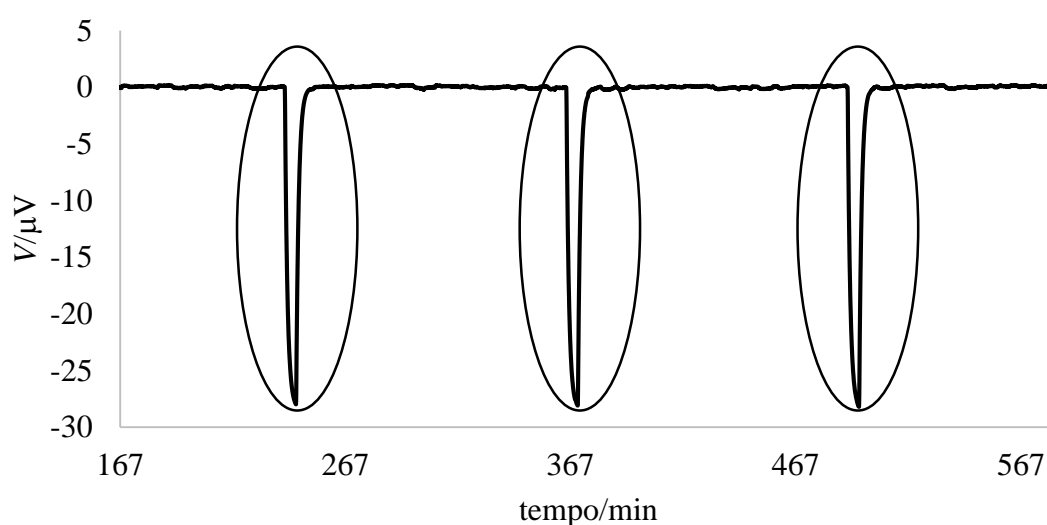


Figura 5. Diferença de potencial em função do tempo durante três calibrações elétricas em H₂O *millipore*.

Quadro 1. Constante de calibração do calorímetro obtida com H₂O, meio e culturas em fase estacionária (ver quadro A1 para os valores individuais).

$\varepsilon/\mu\text{W}\cdot\mu\text{V}^{-1}$	H ₂ O	Meio	Cultura
Média	15,52±0,07 (n=12)	15,3±0,2 (n=18)	15,5±0,4 (n=11)
Média ponderada	15,5±0,2		

Na sequência destes estudos, foi-se tentar perceber se os estímulos efetuados no reator são detetados desde o momento da sua aplicação ou apenas dois minutos depois (duração do percurso entre o reator e a célula calorimétrica). Para isso, colocou-se uma resistência no reator de vidro e procedeu-se à libertação de calor nesse local para testar se este era detetado na célula calorimétrica ou dissipado ao longo do percurso entre o reator e a célula. Não se observou quaisquer perturbações da linha de base ao efetuar este procedimento, o que significa que o calor injetado no reator foi dissipado no percurso até a célula calorimétrica (não se mostrou estes resultados). Deste modo, conclui-se que só se observa o efeito de quaisquer perturbações efetuadas na amostra presente no reator cerca de dois minutos depois, o que significa que nas experiências com adições de H₂O₂ em culturas celulares perde-se os dois primeiros minutos da resposta.

2.5.2 Efeito da adição de H₂O₂ a H₂O e meio

Foi necessário garantir que o efeito observado no momento da adição de H₂O₂ às culturas se deve à resposta celular e não a possíveis interferências de componentes do meio. Deste modo, procedeu-se a uma série de adições de H₂O₂, de forma a obter uma concentração de 150 μM por adição (concentração a que as células são expostas) em 20 mL de meio ou H₂O para perceber se estas são detetadas por calorimetria.

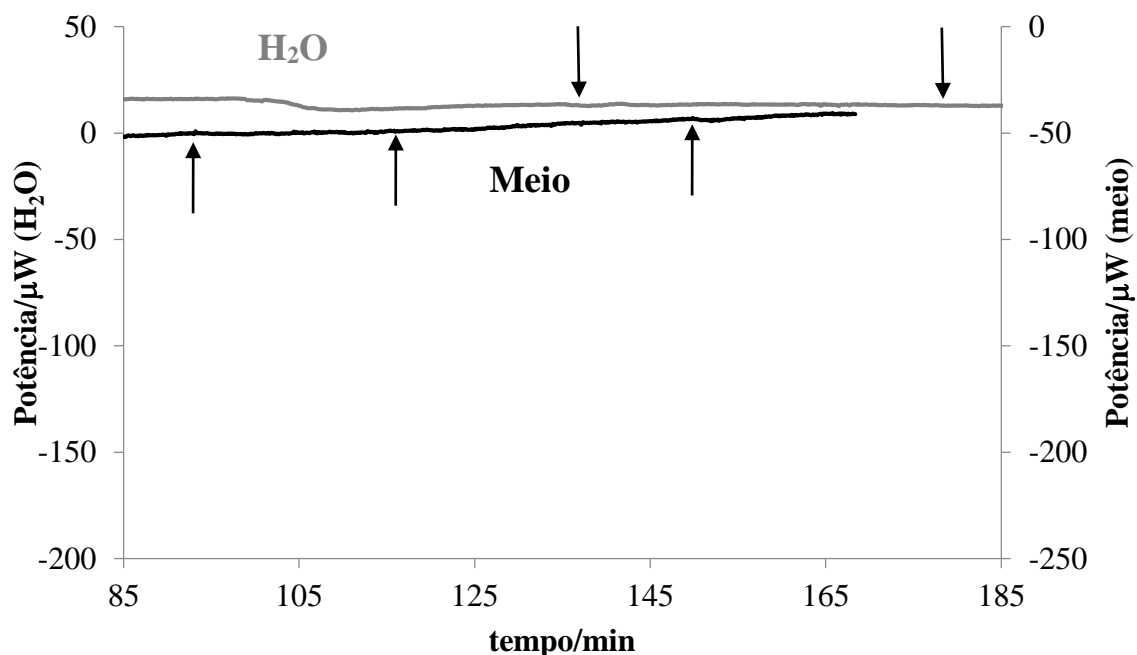


Figura 6. Efeito da adição de H_2O_2 ao meio (linha escura) e a H_2O (linha clara). Utilizou-se uma escala de potência dissipada igual às das experiências em que se visualizou o efeito imediato do H_2O_2 em culturas celulares (ver figura 16). As setas indicam instantes de adição de H_2O_2 .

Como se pode observar pela figura 6, as adições de H_2O_2 ao meio ou H_2O não provocam perturbações significativas sobre a linha de base, pelo que não deve haver interferências de componentes do meio na resposta celular.

Num âmbito relacionado, expôs-se células em fase exponencial a lixívia 20 % (v/v) de maneira a provar que o sinal elétrico observado na presença de células se deve, de facto, à potência dissipada pelas células. Inicialmente, observa-se um grande aumento da potência dissipada detetada, que deverá estar associado ao rebentamento celular causado pela lixívia. De seguida, o sinal decresce rapidamente até, aproximadamente, o nível da linha de base obtida com meio, o que se deve à morte celular (resultados não mostrados). Deste modo, comprova-se que o sinal obtido é devido à presença de células vivas em circulação no calorímetro, uma vez que quando são mortas se deixa de detetar diferenças em relação à circulação de meio.

2.6 Estudo das diferentes fases do crescimento da *S. cerevisiae* por calorimetria

2.6.1 Associação entre o número de células e a densidade ótica

Um dos objetivos deste trabalho foi estudar o metabolismo celular por análise da potência dissipada por célula. Uma vez que o fator de conversão de densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) e o número de células não era bem conhecido, teve que ser determinado para ser possível obter a potência por célula por acompanhamento da potência dissipada e da OD_{600} ao longo do crescimento celular. O procedimento para determinar este fator consistiu em: colocar uma cultura a crescer com um OD_{600} inicial de $\sim 0,035$ na incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen; medir a OD_{600} sensivelmente de hora a hora num espectrofotômetro; diluir a amostra utilizada para medir a OD_{600} diretamente da *cuvette* para um *ependorf* de maneira a contar entre 20 e 100 células por quadrado de 1 mm x 1 mm num hemocitômetro. Mediu-se sempre um valor de OD_{600} até 0,1-0,12 para evitar chegar à zona de saturação do sinal obtido. Para isso, quando necessário, diluiu-se a amostra removida da cultura para um volume final de 1mL.

2.6.2 Análise do crescimento de culturas de *S. cerevisiae*

O objetivo destas experiências foi o de acompanhar a potência dissipada pela população celular e a potência dissipada por célula ao longo do crescimento, analisando-se assim o metabolismo celular. Para isso, preparou-se uma cultura inicial de *S.cerevisiae* e, a partir dessa, quatro outras que foram monitorizadas em paralelo: seguiu-se o crescimento de uma por calorimetria e das outras três por medições de OD_{600} . Para se obter informações relativas a toda a curva de crescimento, este foi acompanhado desde o início da fase lag (OD_{600} inicial de $\sim 0,035$) até se obter um sinal calorimétrico bem definido na fase estacionária. É conhecido que a alteração do tamanho do inóculo (OD_{600} inicial) afeta a escala de tempo das curvas *P-t* obtidas, ou seja, momentos característicos

do crescimento celular como a mudança diáuxica ocorrem tanto mais tarde quanto maior for o inóculo (Hashimoto & Takashi, 1982). Deste modo, tentou-se manter o tamanho do inóculo inicial o mais semelhante entre experiências diferentes possível.

No dia anterior a todas as experiências, colocou-se meio estéril a circular entre o reator de vidro e a célula calorimétrica. Antes de se iniciar qualquer experiência traçou-se uma linha de base por tempo suficiente para se confirmar a sua estabilidade (30 min no mínimo). De seguida, removeu-se o reator com meio da incubadora e colocou-se outro com a cultura no seu lugar. Posteriormente, transferiu-se o tubo de Teflon de entrada no calorímetro, do meio para a cultura, e, após todo o meio ter saído do circuito, transferiu-se também o tubo de saída. Cerca de dois minutos depois, observou-se uma diminuição na diferença de potencial medida associada ao facto do sinal calorimétrico das células ser mais exotérmico que o do meio.

As culturas usadas para acompanhar o crescimento celular por medições de OD₆₀₀ foram crescidas em balões erlenmeyer na incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen, enquanto que a cultura cujo crescimento foi seguido por calorimetria se encontrou na incubadora adjacente ao calorímetro. As determinações de OD₆₀₀ foram feitas, aproximadamente, de hora a hora.

2.7 Estudo da resposta da *S. cerevisiae* a adições bolus e contínuas de doses sub-letais de H₂O₂

2.7.1 Exposição das culturas de *S. cerevisiae* a uma adição de uma dose estacionária de H₂O₂

Com estas experiências pretendeu-se estudar o efeito de uma dose estacionária de H₂O₂ sobre o metabolismo celular, analisando-se para isso o crescimento seguido por calorimetria e por medições de OD₆₀₀.

O procedimento seguido foi idêntico ao referido em 2.6.2. Deixou-se meio estéril em circulação durante a noite para obter a linha de base, e a experiência foi iniciada substituindo o meio em circulação pela cultura. Prepararam-se cinco culturas a partir de uma cultura inicial, tendo todas sido monitorizadas em paralelo. Duas das culturas foram colocadas na incubadora do calorímetro, uma num reator de vidro e a outra num balão erlenmeyer, tendo sido utilizadas para seguir o crescimento por calorimetria e por medições de OD₆₀₀ sensivelmente de hora a hora, respetivamente. No entanto, ao atingirem cerca dos 0,25 OD₆₀₀ (1 OD₆₀₀ está associado a $(2,94 \pm 0,12) \times 10^7$ células, ver secção 3.1.2), início da fase exponencial, foram expostas a uma dose estacionária subletal de 150-200 µM de H₂O₂ (Cyrne *et al.*, 2010) durante 90 min. A quantidade de H₂O₂ normalizada por célula foi de ~ 0,41-0,54 pmol/célula no início do estado estacionário e ~ 0,20-0,27 pmol/célula no final assumindo um tempo de duplicação de 90 min. Teve-se o cuidado de fazer este tratamento sempre o mais próximo possível dos 0,25 OD₆₀₀, uma vez que já se observou que a resistência a stress oxidativo, inclusive ao causado pelo H₂O₂, se altera ao longo da fase exponencial (Slavov *et al.*, 2014). Assim, fazer a exposição ao H₂O₂ sempre ao mesmo valor de OD₆₀₀ é crucial para ter a melhor reprodutibilidade possível. Em simultâneo, cresceu-se as outras três culturas na incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen e monitorizou-se o seu crescimento por medições de OD₆₀₀. Estas últimas sem exposição a H₂O₂, sendo utilizadas como controlo. Nesta experiência, as medições de OD₆₀₀ também foram feitas ao longo de toda a curva de crescimento (da fase lag à estacionária).

Em 2.6.2, as culturas utilizadas para prever o crescimento da analisada por calorimetria foram crescidas na incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen. Neste ponto, a cultura utilizada para as medições de OD₆₀₀ exposta à dose estacionária de H₂O₂, ou seja, para prever o crescimento da analisada calorimetricamente, foi crescida na incubadora

adjacente ao calorímetro. Assim, realizou-se três experiências do gênero das de 2.6.2, ou seja sem exposição a H_2O_2 , em que se cresceu duas culturas (uma analisada por calorimetria e outra por medições de OD_{600}) na incubadora adjacente ao calorímetro, não se tendo observado diferenças nem ao nível da calorimetria nem ao nível das medições de OD_{600} com as experiências descritas em 2.6.2. Assim, as diferenças de protocolo entre 2.6.2 e este não afetaram os resultados obtidos.

2.7.1.1 Exposição ao H_2O_2

Para manter as culturas da incubadora adjacente ao calorímetro expostas a uma concentração de H_2O_2 aproximadamente constante, adicionou-se uma concentração inicial de 150 μM com a bureta automática. De seguida, programou-se a bureta para fazer adições sequenciais, minuto a minuto, de um volume que permita obter uma velocidade de adição de H_2O_2 igual à velocidade com que as células o consomem, assumindo que a sua constante de consumo é $k_{\text{consumo}} = 0,067 \text{ min}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ (valor não publicado usado correntemente no laboratório) e que a sua cinética de consumo pode ser aproximada a uma cinética de primeira-ordem a doses sub-letais (Marinho *et al.*, 2013a, Marinho *et al.*, 2013). Teve-se o cuidado de adaptar o volume de H_2O_2 adicionado em função da evolução da OD_{600} , nas duas culturas da incubadora adjacente ao calorímetro, ao longo dos 90 min de adaptação, de maneira a compensar o efeito do aumento do número de células na velocidade de consumo.

Mediram-se as concentrações de H_2O_2 da cultura da incubadora adjacente ao calorímetro utilizada para acompanhar a OD_{600} aos 30, 60 e 90 min após a adição inicial de 150 μM , regulando a adição de H_2O_2 nas duas culturas presentes nessa incubadora sempre que se obtinha uma concentração superior ou inferior à pretendida. Para efetuar estas medições recorreu-se a um ensaio enzimático que consiste na adição de catalase à

cultura e na quantificação do O₂ libertado (Marinho *et al.*, 2013a), resultante da sua atividade. A quantificação do O₂ é feita num elétron de oxigénio (Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK), com agitação magnética e controlo de temperatura. Antes de quantificar a concentração de H₂O₂ a que as células estão expostas, traçou-se uma curva de calibração diariamente, de maneira a que a concentração pretendida na cultura esteja na gama de concentrações da curva. Para obter esta curva de calibração analisou-se a resposta do elétron para uma série de soluções de H₂O₂ de concentração conhecida ao serem expostas ao catalase. O procedimento para efetuar as medições foi: adicionar 400 µL de cultura ou padrão de H₂O₂ a 400 µL de tampão de fosfatos de potássio (TFK) à câmara do elétron; após ter uma linha de base estável, adicionar 15 µL de uma solução de catalase 1mg/mL; ocorre uma subida no sinal obtido resultante da libertação de O₂ e, quando o sinal estabiliza, tira-se a variação do sinal entre a linha de base prévia à adição do catalase e a posterior; remover o conteúdo da câmara e lavar várias vezes com água destilada. Assim, traçou-se uma curva que relaciona o sinal associado ao O₂ libertado vs concentração de H₂O₂ e utilizou-se esta curva para determinar a concentração de H₂O₂ a que as células estão expostas a partir da variação de sinal obtida nas culturas analisadas.

2.7.2 Exposição das culturas de *S. cerevisiae* a adições bolus de H₂O₂

Nestas experiências pretendeu-se estudar o efeito de adições bolus de H₂O₂ sobre o metabolismo celular, analisando-se para isso o crescimento por calorimetria e por medições de OD₆₀₀.

O início do procedimento foi semelhante ao referido em 2.6.2. Preparou-se uma cultura inicial que foi dividida em quatro. Estas culturas foram crescidas na incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen até atingirem cerca dos 0,20-0,25 OD₆₀₀. Nesse momento dividiram-se cada uma de três delas em duas culturas, que foram crescidas nessa mesma

incubadora e utilizadas para acompanhar o crescimento por medições de OD₆₀₀, sensivelmente a cada hora, durante a fase exponencial (entre as 3 e as 10h). A outra foi crescida num reator de vidro na incubadora adjacente ao calorímetro e foi utilizada para seguir o crescimento calorimetricamente. A cerca dos 0,25 OD₆₀₀ (1 OD₆₀₀ está associado a $(2,94 \pm 0,12) \times 10^7$ células, tratamento de resultados, secção 3.1.2), início da fase exponencial, a cultura seguida por calorimetria e três das culturas da incubadora Infors AG CH-4103 Bottmingen foram expostas a três adições bolus sub-letais de 150 µM de H₂O₂ (Cyrne *et al.*, 2010) espaçadas de 40min (0, 40 e 80 min). A quantidade de H₂O₂ normalizada por célula foi de ~ 0,41, 0,27 e 0,22 pmol/célula na primeira, segunda e terceira adições, respetivamente, assumindo um tempo de duplicação de 90 min. Mais uma vez, teve-se o cuidado de fazer este tratamento sempre o mais próximo possível dos 0,25 OD₆₀₀, devido à variação da resistência ao H₂O₂ ao longo da fase exponencial (Slavov *et al.*, 2014). Utilizaram-se as culturas sem exposição a H₂O₂ como controlo, tal como em 2.7.1.

Neste procedimento, ao contrário dos descritos em 2.6.2 e 2.7.1, só se transportou a cultura analisada calorimetricamente para o reator e a incubadora adjacente ao calorímetro quando atingiu cerca dos 0,20-0,25 OD₆₀₀. Para garantir que estas diferenças não tiveram influência nos resultados obtidos fizeram-se duas experiências descritas em 2.7.1 com um protocolo idêntico ao referido nesta secção, ou seja, colocando a cultura analisada por calorimetria no reator e na incubadora adjacente ao calorímetro apenas ao atingir os 0,20-0,25 OD₆₀₀ onde foi exposta a uma dose estacionária de H₂O₂ (ver 2.7.1). Os resultados obtidos com este protocolo foram iguais aos obtidos com o protocolo de 2.7.1, o que significa que as alterações de protocolo deste ponto não influenciaram os resultados obtidos nestes estudos.

2.8 Estatística

Os resultados estão expressos como a média \pm desvio-padrão. O número de experiências independentes (n) utilizado está sempre indicado. Utilizou-se intervalos de confiança de 99 ou 95% para tratar os parâmetros analisados. Para determinar se as diferenças observadas entre grupos tinham significado estatístico, efetuou-se uma análise estatística através da aplicação de testes t de *Student* bicaudais; consideram-se como significativos valores-p inferiores a 0,05. Sempre que se obteve um parâmetro estatisticamente diferente do controlo com um valor-p entre 0,01 e 0,05 assinalou-se com um * e com ** quando inferior a 0,01.

3. Tratamento de resultados

3.1 Estudo das diferentes fases do crescimento da *S. cerevisiae* por calorimetria

Com o objetivo de fazer uma análise metabólica global de culturas *batch* de *S. cerevisiae* ao longo de todo o seu crescimento, seguiu-se o crescimento celular por calorimetria e por medições de OD₆₀₀. Esta informação foi utilizada para estudar o metabolismo ao nível da população como um todo e de uma célula individual.

3.1.1 Análise da potência dissipada ao longo do crescimento celular

Na figura 7 é apresentada a potência dissipada e evolução da OD₆₀₀ ao longo do crescimento da *S. cerevisiae*. Começa-se por detetar um período com uma taxa de crescimento reduzida, que consiste na fase lag (região A na Figura 7). Durante este período a potência dissipada é reduzida e cresce a um ritmo baixo. De seguida, observa-se um aumento exponencial do número de células e da potência dissipada, que está associado à fase exponencial (região B). A transição diáuxica (fronteira entre a região B e C) deteta-

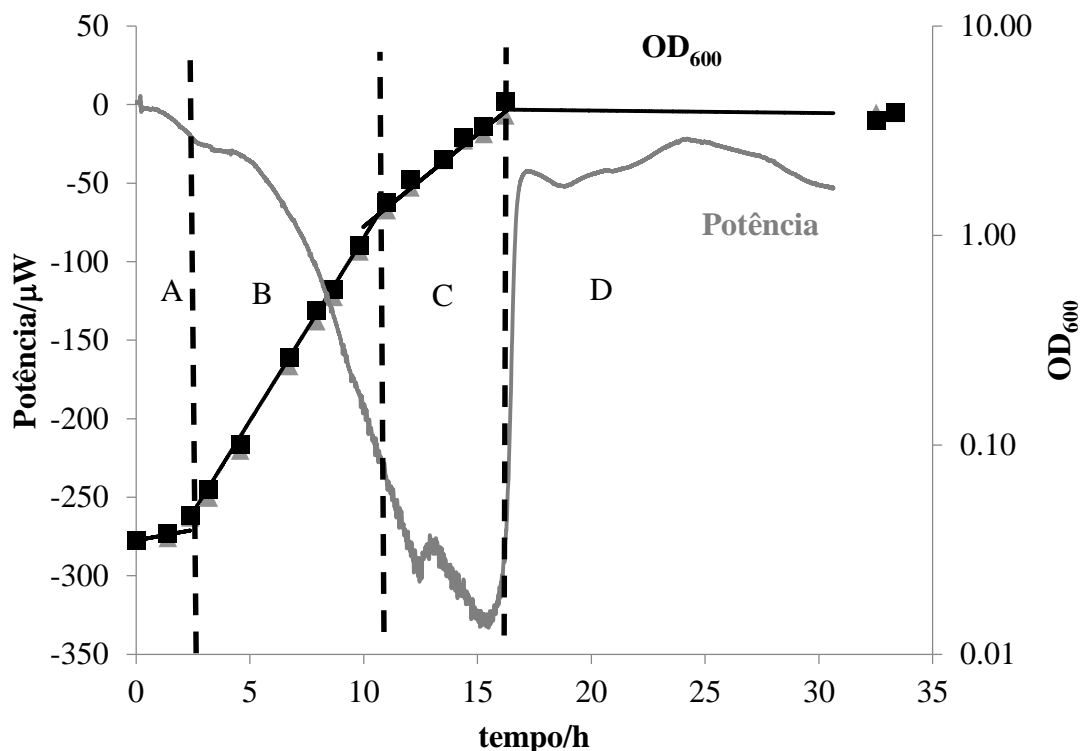


Figura 7. Curvas de crescimento da *S. cerevisiae* seguidas pela potência dissipada e OD_{600} . A fase lag, exponencial, pós-diáuxica e estacionária são representadas por A, B, C, e D, respetivamente. Os pontos correspondem aos valores de OD_{600} medidos experimentalmente (os quadrados e os triângulos correspondem a duas culturas acompanhadas em paralelo), a linha escura é um conjunto de quatro ajustes (uma por cada fase) aos pontos experimentais e a linha clara representa a potência.

se mais cedo na curva de OD_{600} , correspondendo ao momento em que a taxa de crescimento diminui. Este fenómeno ocorre enquanto a potência dissipada ainda se encontra na fase de aumento rápido associada à fase exponencial. Assim, a diminuição da taxa de divisão celular ocorre antes de se atingir o primeiro máximo da potência dissipada. Após este máximo ser atingido a potência dissipada decresce durante um curto período de tempo e volta a aumentar durante o resto da fase pós-diáuxica a um ritmo menor que o da fase exponencial (região C) até se atingir um segundo máximo. Por último, deteta-se a fase estacionária (região D) que se inicia quando cessa (praticamente) o aumento do número de células. Observa-se que, nesse momento cessa também o aumento da potência dissipada e esta decresce até atingir uma linha de base relativamente estável.

As curvas de OD₆₀₀ e $P-t$ obtidas neste trabalho são semelhantes às típicas descritas na literatura (Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972, Higuera-Guisset *et al.*, 2005). Além disso, observa-se que o crescimento celular pode ser acompanhado por calorimetria e que esta técnica permite detetar os seus eventos característicos (ex: transição diáuxica) em tempo real. No entanto, nas condições usadas neste trabalho a transição diáuxica inicia-se antes de se atingir o primeiro máximo da potência dissipada e não em simultâneo como assumido na literatura. (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978, Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972).

Para analisar as curvas $P-t$ obtidas neste trabalho de uma forma quantitativa, determinaram-se vários parâmetros que as descrevem. Os parâmetros escolhidos foram o valor de potência dissipada nalguns momentos característicos do crescimento e a duração de alguns períodos. Estes encontram-se representados na figura 8. No início da fase lag a potência dissipada foi $3,6 \pm 1,4 \mu\text{W}$, este valor aumentou continuamente ao longo da fase exponencial e no primeiro pico de intensidade após a transição diáuxica observou-se uma potência de $304 \pm 17 \mu\text{W}$. O máximo da potência observa-se no final da fase pós-diáuxica quando cessa o crescimento e é de $324 \pm 9 \mu\text{W}$. O abrandamento metabólico típico da fase estacionária resulta numa potência dissipada de apenas $36 \pm 5 \mu\text{W}$. Obteve-se também, aproximadamente, o tempo necessário para ocorrer a transição diáuxica (duração de A+B) ($11,8 \pm 0,8 \text{ h}$) e a duração da fase pós-diáuxica ($4,8 \pm 0,4 \text{ h}$). Estes parâmetros são muito reprodutíveis, sendo que o erro variou entre 2 e 8 %, exceto para as potências dissipadas no início das fases lag e estacionária, em que foi de 38 e 12 %, respetivamente. A menor reprodutibilidade destes dois parâmetros deve-se ao facto de corresponderem valores muito pequenos e, portanto, serem mais afetados por pequenas alterações no sinal calorimétrico.

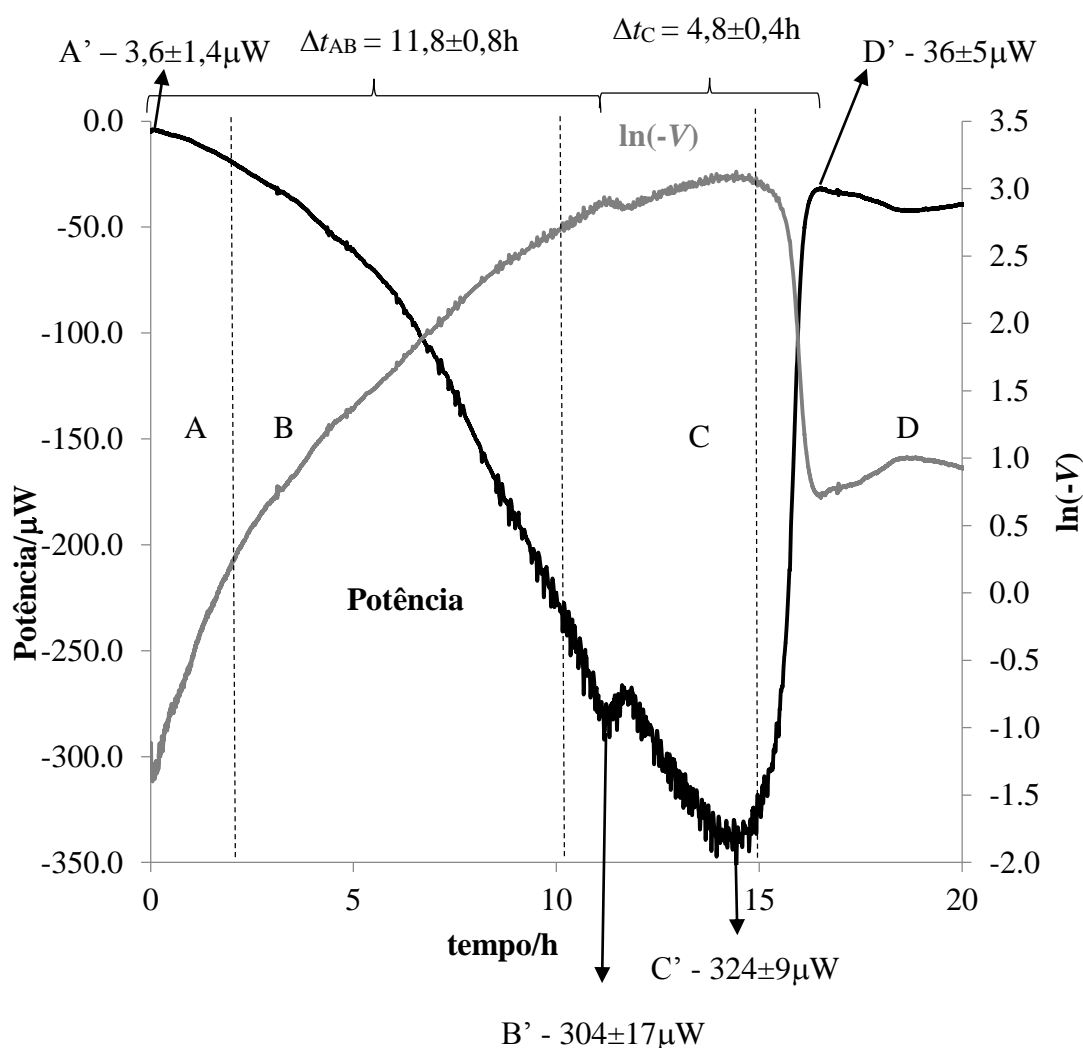


Figura 8. Curva de crescimento da *S. cerevisiae* seguida pela potência dissipada e representação do logaritmo neperiano do simétrico da diferença de potencial medida, $\ln(-V)$, em função do tempo. A fase lag, exponencial, pós-diáuxica e estacionária são representadas por A, B, C e D, respectivamente. A linha escura representa a potência e a linha clara descreve o $\ln(-V)$. No gráfico, estão representadas as durações aproximadas da fase lag até à transição diáuxica (Δt_{AB}) e da fase pós-diáuxica (Δt_C) e os valores de potência dissipada no início da fase lag (A'), do pico de potência dissipada após a transição diáuxica (B'), na fase estacionária (D') e o seu valor máximo (C'). O número de experiências, n , utilizado para obter estes valores foi 6 ou 7, exceto para a potência dissipada na fase estacionária, em que foi 4 (ver quadro A5 para os resultados individuais).

Ainda na figura 8, sobrepôs-se o logaritmo neperiano do simétrico do sinal calorimétrico, $\ln(-V)$, obtido com uma curva de crescimento analisada pela potência dissipada pela população celular. Alterações de declive do $\ln(-V)$ resultam de alterações no nível do calor libertado por unidade de tempo. Esta representação foi muito útil pois permitiu mostrar

que a fase em que há um aumento mais rápido da potência dissipada é a lag, seguida da exponencial, da pós-diáuxica e, por último, da estacionária. Uma vez que a transição diáuxica ocorre antes do máximo da potência dissipada, o declive do $\ln(-V)$ no início da fase pós-diáuxica é idêntico ao do final da exponencial. Além disso, percebe-se que o ritmo da variação da potência dissipada na fase exponencial e pós-diáuxica não é constante, indo decrescendo gradualmente durante ambas as fases. Na fase lag também parece decrescer, mas não de forma tão evidente.

3.1.2 Análise da potência dissipada por célula ao longo de uma curva de crescimento

Existem várias evidências de que o metabolismo é altamente dinâmico ao longo de toda a curva de crescimento (Slavov *et al.*, 2014) e não há uma proporcionalidade constante e permanente entre a potência dissipada total e o número de células (Braissant *et al.*, 2013, Hashimoto & Takashi, 1982). Desta forma, é previsível que a potência dissipada por célula varie ao longo do crescimento, como já foi sugerido por vários autores (Braissant *et al.*, 2013, Higuera-Guisset *et al.*, 2005), no entanto, nunca se fez este tipo de estudo ao longo de todo o crescimento.

Assim, normalizou-se a potência dissipada pela população celular ao longo do crescimento pelo número de células em cada momento para avaliar o metabolismo associado a uma célula isolada. Para atingir este objetivo começou-se por fazer uma associação entre o número de células e medidas de OD₆₀₀, tendo-se obtido um fator de conversão de OD₆₀₀ para células/mL. De seguida, calculou-se o número de células presentes na célula calorimétrica ao longo do crescimento e obteve-se a potência dissipada por célula para toda a curva.

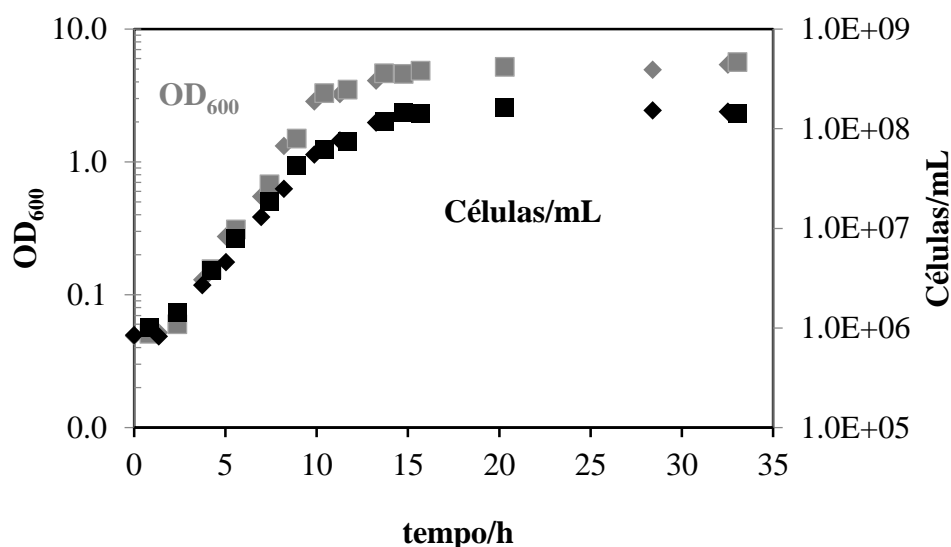


Figura 9. Comparação do crescimento da *S. cerevisiae* seguida pela medição da OD₆₀₀ e por contagem de células num hemocitômetro. Os quadrados e os losangos distinguem as duas culturas, oriundas de pré-culturas diferentes estudadas num único dia. Os pontos a preto correspondem a células/mL e os a cinzento a OD₆₀₀.

Na figura 9 compara-se o crescimento celular de várias culturas distintas acompanhado simultaneamente por medições de OD₆₀₀ e por contagem de células utilizando um hemocitômetro. Como se pode observar, o perfil de crescimento obtido com os dois métodos é idêntico. A representação do número de células/mL, $n_{\text{células}}$, em função de OD₆₀₀ para os quatro ensaios deste tipo realizados está ilustrada na figura 10. A média dos declives obtidos por ajuste linear de $n_{\text{células}}$ vs. OD₆₀₀ para cada um dos ensaios individuais conduziu ao valor $(2,94 \pm 0,12) \times 10^7 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ (ver quadro A2 para os valores individuais). Este fator foi utilizado para converter as curvas de crescimento acompanhadas por medições de OD₆₀₀ para células/mL. De seguida, utilizaram-se estas curvas para normalizar as de potência dissipada obtendo-se assim a potência dissipada por uma célula individual ao longo de todo o crescimento, como está representado na figura 11. Note-se que o perfil da curva da potência dissipada é completamente diferente do perfil da curva de potência dissipada por célula. A potência dissipada por célula aumenta ao longo da fase lag e atinge o seu máximo na transição da fase lag para a exponencial.

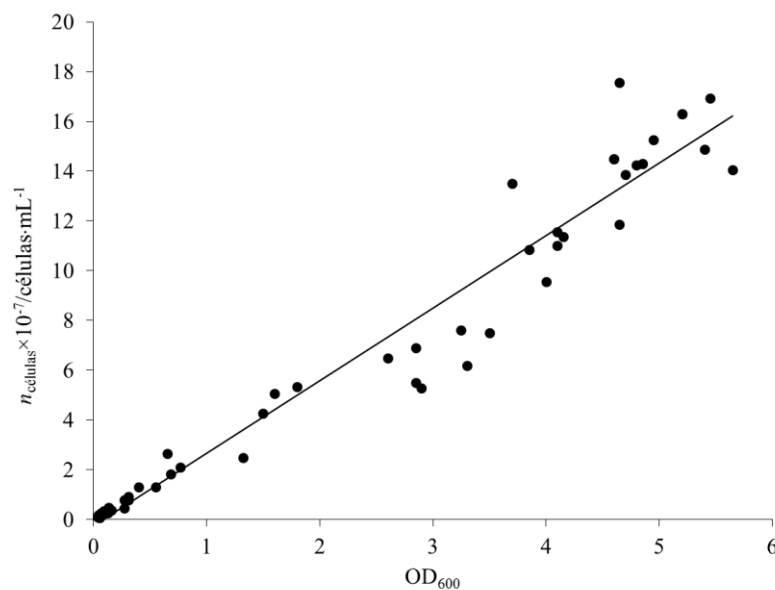


Figura 10. Correlação entre o número de células/mL, $n_{\text{células}}$, em função da OD₆₀₀ para diferentes culturas de *S. cerevisiae*.

A partir desse momento decresce até à transição diáuxica onde se mantém aproximadamente constante durante aproximadamente duas horas. Poderá ser neste período que ocorre a remodelação metabólica associada à fase pós-diáuxica. É de salientar que, se assim for, o final da remodelação metabólica ocorre simultaneamente com o máximo da potência dissipada que se segue à fase pós-diáuxica e que o seu início se dá ainda durante o crescimento exponencial da potência dissipada. Portanto, tal como em 3.1.1, parece que a fase pós-diáuxica se inicia antes daquilo que apenas a potência dissipada sugere. Após este período, decresce novamente durante o resto da fase pós-diáuxica e durante a fase estacionária até se atingir o valor de potência dissipada por célula mínimo.

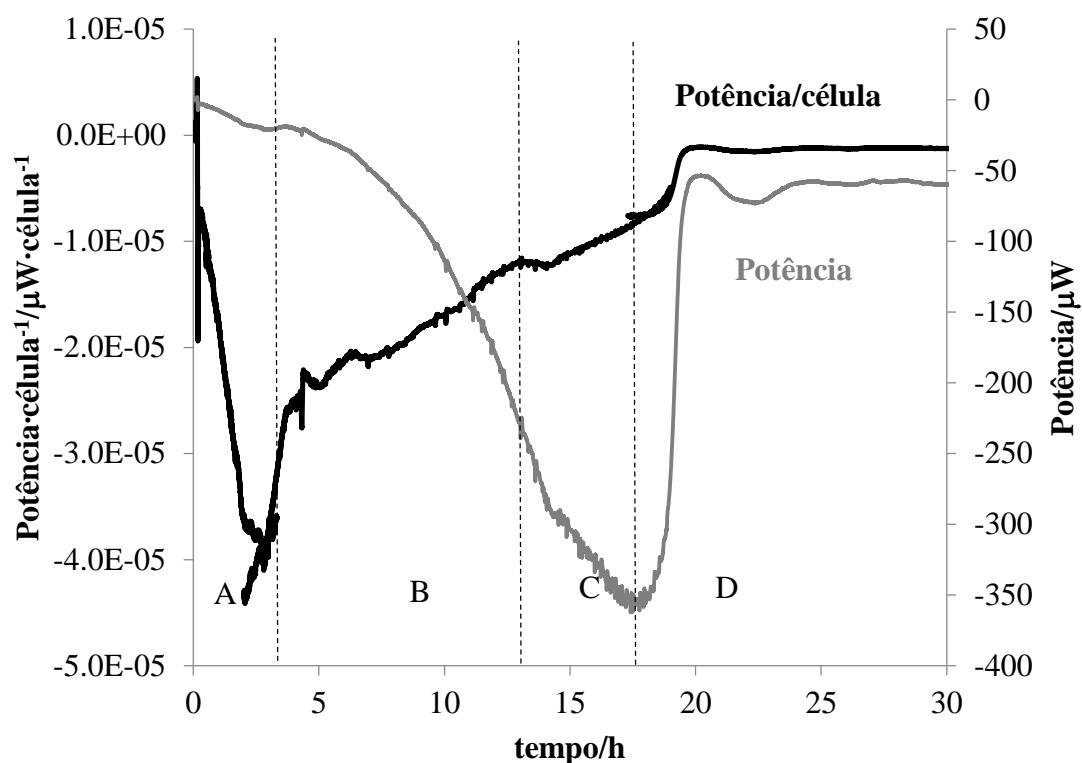


Figura 11. Crescimento da *S. cerevisiae* seguido pela potência dissipada e valor da potência dissipada por célula durante as várias fases de crescimento. A fase lag, exponencial, pós-diáuxica e estacionária são representadas por A, B, C e D, respetivamente. A linha escura representa a potência dissipada por célula e a linha clara descreve a potência dissipada pela população.

Esta observação de que a potência por célula se modifica continuamente é coerente com a informação existente na literatura sobre o metabolismo da *S. cerevisiae* ao longo do tempo, em que se defende que este se encontra num ajuste contínuo ao longo de tempo e não num estado estático (Slavov *et al.*, 2014). Note-se que a fase lag e o início da pós-diáuxica são os únicos períodos em que a potência por célula não está a decrescer. Estas fases estão associadas a uma grande remodelação metabólica (Rolfe *et al.*, 2012, Schiraldi, 1995, Brauer *et al.*, 2005, Haurie *et al.*, 2001), o que pode justificar esta observação.

O facto da fase lag ter maior potência dissipada por célula que o início da pós-diáuxica pode ser justificado com a extensão da remodelação metabólica que ocorre nestes dois períodos. De acordo com o protocolo experimental adotado neste trabalho, as células entram na fase lag após terem estado em fase estacionária (pré-cultura), enquanto a fase

pós-diáuxica se segue à exponencial. Assim, parece evidente que a magnitude da remodelação metabólica é muito maior na fase lag do que na pós-diáuxica.

Determinaram-se vários parâmetros que descrevem a curva da potência dissipada por célula, tal como se fez para as curvas $P-t$. Deste modo, os valores típicos de potência por célula, os tempos a que eventos característicos ocorrem e os declives de algumas secções da curva encontram-se discriminados na figura 12 e no quadro 2. O valor de potência dissipada por célula no início da fase lag (A) foi de $7,4 \pm 0,9 \text{ pW} \cdot \text{célula}^{-1}$ (A' na figura 12). Esta aumenta até atingir $37 \pm 4 \text{ pW} \cdot \text{célula}^{-1}$ no momento da transição da fase lag para a exponencial (B'). Após a queda rápida no início da exponencial (esta queda rápida não acontece sempre) o seu valor é de $27 \pm 3 \text{ pW} \cdot \text{célula}^{-1}$ (C'). Decresce continuamente até à transição diáuxica em que atinge $15,9 \pm 0,5 \text{ pW} \cdot \text{célula}^{-1}$ (D'). No fim da remodelação metabólica da transição diáuxica (C) a potência dissipada por célula é de $15 \pm 1 \text{ pW} \cdot \text{célula}^{-1}$ (E'). Note-se que a potência dissipada por célula aumentou neste período. Decresce até ao início da fase estacionária, em que atinge os $7,8 \pm 2,0 \text{ pW} \cdot \text{célula}^{-1}$ (F'). De seguida, atinge-se uma linha de base estável de $0,9 \pm 0,3 \text{ pW} \cdot \text{célula}^{-1}$ (G'). Obteve-se também o tempo a que se atinge o máximo da potência dissipada por célula (transição de A para B), que ocorre aproximadamente $2,9 \pm 0,4 \text{ h}$ depois do início da curva. O momento em que ocorre a transição diáuxica ($10,7 \pm 0,5 \text{ h}$) e as durações da fase pós-diáuxica ($6,2 \pm 0,4 \text{ h}$) e da remodelação metabólica ($1,7 \pm 0,5 \text{ h}$) (figura 12 e quadro 2). A reprodutibilidade obtida na determinação dos parâmetros da figura 12 foi relativamente boa, uma vez que o erro variou entre 3 e 12 %, exceto para os valores no início e durante a fase estacionária, em que foram 25 e 34 %, respetivamente, o que deverá dever-se ao facto de terem valores muito baixos. Quanto ao quadro 2, o seu erro foi muito maior (variou entre 18 e 51 %) para os declives, mas relativamente baixo para os momentos ou durações de períodos específicos do crescimento.

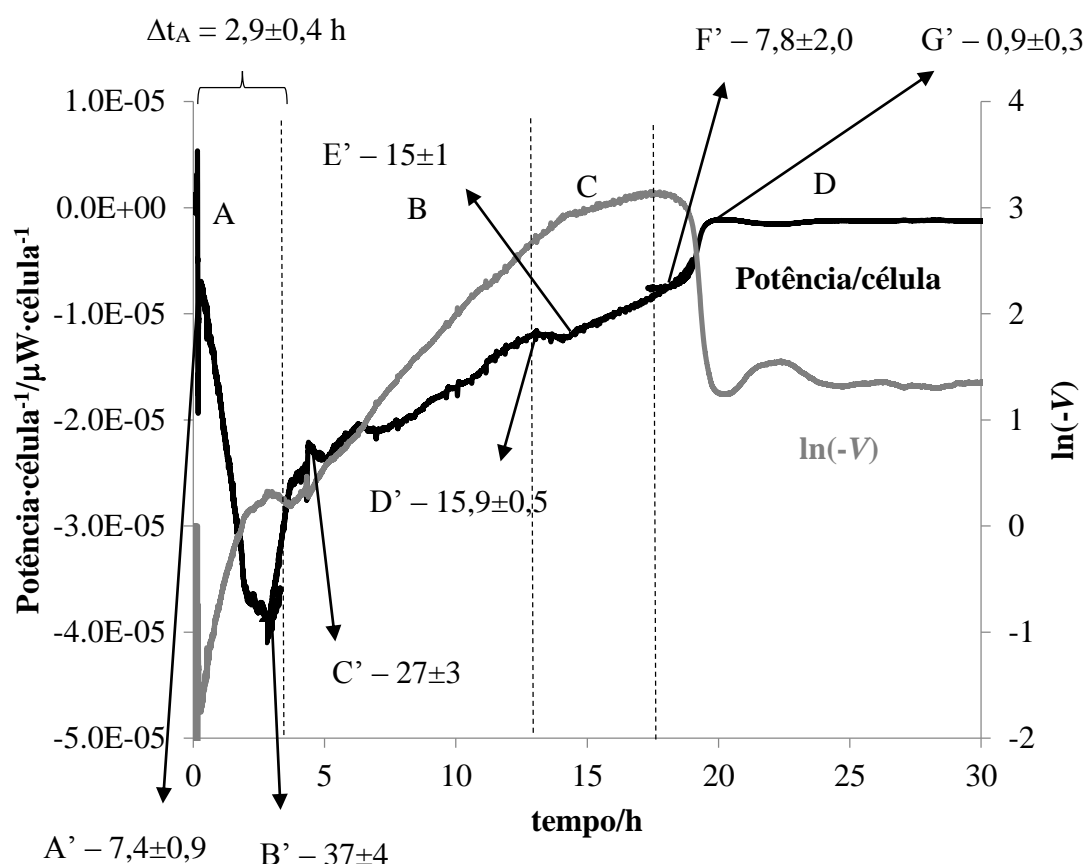


Figura 12. Logaritmo neperiano do simétrico da diferença de potencial medida ($\ln(-V)$) e potência dissipada por célula durante o crescimento da *S. cerevisiae*. A fase lag, exponencial, pós-diáuxica e estacionária são representadas por A, B, C e D, respetivamente. A linha escura representa a potência dissipada por célula e a linha clara descreve o $\ln(-V)$. No gráfico, estão representadas a duração da fase lag (Δt_A) e os valores de potência dissipada por célula ($\text{pW} \cdot \text{célula}^{-1}$) no início da fase lag (A'), no final da queda rápida da fase exponencial (C'), na transição diáuxica (D'), no final da remodelação metabólica da fase pós-diáuxica (E'), no início da fase estacionária (F'), no momento em que o sinal estabiliza (G') e o valor mínimo (B'). O n destes parâmetros variou entre 5 e 7. Ver quadro A3 para os replicados individuais.

A reprodutibilidade de valores em termos de potência por célula é, regra geral, inferior à de parâmetros em termos de potência dissipada (para a população celular), possivelmente, porque há um maior erro associado à medida do número de células do que à potência dissipada.

Como se pode perceber pela figura 12, o facto da potência dissipada por célula ser altamente dinâmica resulta do declive da curva $\ln(-V)$ vs t estar constantemente a variar,

mesmo dentro de cada fase de crescimento, enquanto que a taxa de crescimento é constante para cada uma delas.

Já era aceite que a proporcionalidade direta entre a potência dissipada e o número de células não era válida para toda a curva de crescimento (Braissant *et al.*, 2013, Hashimoto & Takashi., 1982). No entanto, a observação de que a potência por célula se altera continuamente mostra que em parte nenhuma da curva de crescimento, nem sequer na fase exponencial, há uma proporcionalidade direta entre os dados calorimétricos e em termos de número de células, ao contrário do que, geralmente, se assume (Lamprecht, 2003, Roy & Samson, 1988, Hashimoto & Takashi, 1982). Assim, descrever o sinal calorimétrico associado ao crescimento da *S. cerevisiae* e outros microrganismos com uma função exponencial poderá não ser o mais correto.

Quadro 2. Valor da variação potência dissipada por célula ao longo do crescimento, para as culturas controlo de *S. cerevisiae* (ver quadro A4 para os valores individuais).

Culturas controlo	pW·célula ⁻¹ ·h ⁻¹					$t_{\text{transição diáuxica/h}}$	Duração da fase pós-diáuxica/h	Tempo de remodelação/h
	Declive da fase lag	Declive da queda rápida durante a fase exponencial	Declive lento durante a fase exponencial	Declive da fase pós-diáuxica	Declive da remodelação metabólica da fase pós-diáuxica			
Média	-18±5 (n=6)	9±4 (n=5)	2,8±1,0 (n=6)	1,2±0,2 (n=5)	0,36±0,13 (n=5)	10,7±0,5 (n=6)	6,2±0,4 (n=6)	1,7±0,5 (n=6)

3.1.3 Estudo da variação do aproveitamento energético para a divisão celular ao longo do crescimento

Como se mencionou em 3.1.2, os declives das curvas $\ln(-V)$ vs. t e do número de células ao longo do crescimento não são constantes e a sua relação também varia, o que resulta numa potência por célula altamente dinâmica. Desta forma, o aproveitamento energético para a divisão celular varia consoante a fase de crescimento.

Para observar até que ponto é que o desvio energético para o ciclo de divisão celular varia, começou-se por obter os declives de $\ln(-V)$ em quatro períodos, que foram: a fase lag (A'), exponencial (B'), final da exponencial/início da pós-diáuxica (C') e pós-diáuxica (D'), como exemplificado na figura 13. Para simplificar o processo, assumiu-se que estes declives eram constantes em cada um dos períodos referidos.

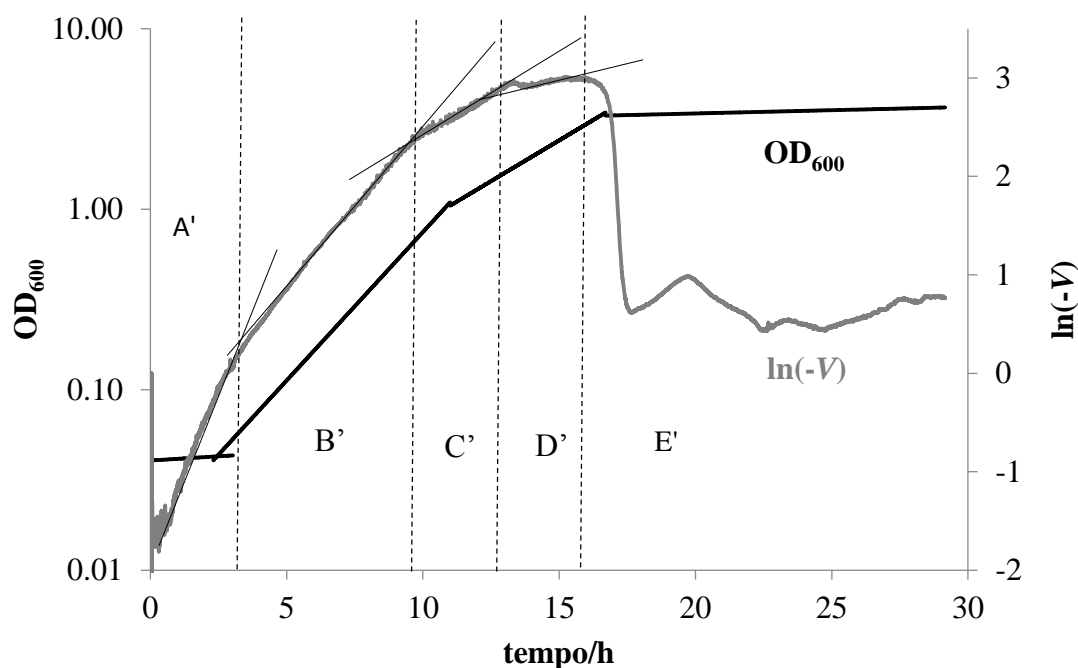


Figura 13. Identificação dos períodos do crescimento celular da *S. cerevisiae* utilizados para analisar o seu direcionamento metabólico. Seguiu-se o crescimento por medições de OD_{600} e este foi comparado com o logaritmo neperiano do simétrico da diferença de potencial medida na população celular total ($\ln(-V)$). A fase lag, exponencial, final da exponencial/início da pós-diáuxica, pós-diáuxica e estacionária são representadas por A', B', C', D' e E', respetivamente. A linha clara representa o $\ln(-V)$ e a linha escura descreve a OD_{600} (regressão dos valores experimentais).

De seguida, dividiram-se os declives associados à evolução do número de células de cada fase de crescimento pelos dos períodos descritos anteriormente (A', B', C' e D'), obtendo-se parâmetros em unidades arbitrárias associados ao desvio energético para o ciclo de divisão celular. No quadro 3 estão representados os valores dos declives de $\ln(-V)$ para os períodos analisados e as taxas de crescimento para as quatro fases de crescimento (evolução do número de células), bem como os quocientes efetuados.

Quadro 3. Análise da variação do direcionamento metabólico para o crescimento celular ao longo das várias fases de crescimento da *S. cerevisiae* para as culturas controlo (ver quadro A8 para os replicados individuais). Dividiu-se a taxa de crescimento da fase lag (OD_{600}) pelo declive de $\ln(-V)$ do período A', a taxa de crescimento da fase exponencial pelos declives de $\ln(-V)$ de B' e C' (o início do C' ocorre durante a fase exponencial), a taxa de crescimento da fase pós-diáuxica pelos declives de C' e D' (C' termina já na fase pós-diáuxica).

Fase de crescimento	Períodos analisados (ln(-V))		μ _{OD} /h ⁻¹	μ _{calorimetria} /h ⁻¹	Aproveitamento energético para divisão celular (μ _{OD} / μ _{calorimetria})
Lag (A)	A'	Lag	0,053±0,043 (n=5)	0,93±0,25 (n=6)	0,071±0,043 (n=4)
Exponencial (B)	B'	Exponencial	0,416±0,027 (n=6)	0,33±0,02 (n=7)	1,15±0,06 (n=5)
	C'	Final da exponencial		0,197±0,016 (n=5)	2,26±0,09 (n=4)
Pós- diáuxica (C)			Início da pós- diáuxica	0,177±0,015 (n=5)	0,91±0,12 (n=5)
	D'	Pós-diáuxica	0,065±0,01 (n=5)		2,98±0,55 (n=4)

Apenas na fase lag e início da fase pós-diáuxica é que o declive associado ao sinal calorimétrico é superior ao declive relativo ao número de células, enquanto para toda a fase exponencial e restante da fase pós-diáuxica é o oposto.

Quanto maior for o quociente $\mu_{OD}/\mu_{calorimetria}$ maior será o desvio energético para o crescimento celular. Assim, o aproveitamento energético, em ordem crescente, é: fase lag ($0,071\pm0,043$) < início da fase pós-diáuxica ($0,91\pm0,12$) < fase exponencial ($1,15\pm0,06$) < final da fase exponencial ($2,26\pm0,09$) \approx fase pós-diáuxica ($2,98\pm0,55$). Todos os valores são significativamente diferentes do imediatamente anterior (com um valor-p sempre inferior a 0,01), exceto o do final da fase pós-diáuxica em relação ao do final da fase exponencial. Deste modo, percebe-se que o aproveitamento energético varia de facto ao longo do crescimento.

A fase de crescimento com menor desvio energético para a divisão celular é a fase lag, o que está de acordo com a literatura (Schiraldi, 1995). Note-se que os dois períodos em que as células têm um foco menor no ciclo de divisão celular são períodos de intensa remodelação metabólica (fase lag e início da fase pós-diáuxica). O facto da fase pós-diáuxica ter maior desvio energético para a divisão celular que a fase exponencial parece ser contraintuitivo, uma vez que é a fase exponencial aquela que está associada a um crescimento mais rápido (Váchová *et al.*, 2012, Longo *et al.*, 1996, Werner-Washburne *et al.*, 1996). No entanto, o metabolismo da fase exponencial da *S. cerevisiae* não parece estar associado ao crescimento mais eficiente, mas àquele que melhor favorece a proliferação celular rápida (Slavov *et al.*, 2014). Assim, a observação de que a fase exponencial tem um desvio energético menor para o ciclo de divisão celular que a pós-diáuxica favorece esta ideia de que o metabolismo fermentativo da *S. cerevisiae* (e outros tipos de células proliferativas como as cancerosas) facilita a sua proliferação rápida apesar de estar associado a um consumo menos eficiente da glucose presente no meio. Ainda de

acordo com esta ideia, na fase pós-diáuxica, apesar de haver uma redução da taxa de crescimento celular devido a uma produção mais lenta de energia (Brauer *et al.*, 2005), parece observar-se um consumo mais eficiente da fonte de carbono (etanol), uma vez que o desvio energético para a divisão celular aumenta. Esta observação deverá resultar da transição para um metabolismo mais oxidativo, reconhecidamente mais eficiente que o fermentativo (Slavov *et al.*, 2014, Zhao *et al.*, 2011, Macintyre & Rathmell, 2013).

3.1.4 Análise das oscilações metabólicas da *S. cerevisiae* detetadas por calorimetria

Uma das características do metabolismo da *S. cerevisiae* é o facto de este estar associado a um comportamento oscilatório. Este comportamento oscilatório pode resultar do facto do metabolismo deste microrganismo ser altamente dinâmico como foi observado por Slavov *et al.* e por Brauer *et al.* (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2005). Observou-se que, em culturas contínuas, mais de metade dos genes deste microrganismo têm uma transcrição com comportamento oscilatório (Brauer *et al.*, 2008). Propuseram-se hipóteses em que se defende que o comportamento oscilatório tem um papel na célula, por exemplo, como uma forma de proteção (Futcher, 2006) ou como a forma de metabolismo mais eficiente (Slavov *et al.*, 2011). Mas também outras que as consideram meros efeitos secundários do metabolismo (Chandra *et al.*, 2011).

No decorrer deste trabalho detetou-se um comportamento oscilatório associado à potência dissipada total e por célula ao longo do tempo, como se pode observar nas figuras 14 e 15. Este comportamento foi descrito nos quadros A19 e A20 para o meio (início do comportamento oscilatório), final da fase exponencial e para a fase pós-diáuxica.

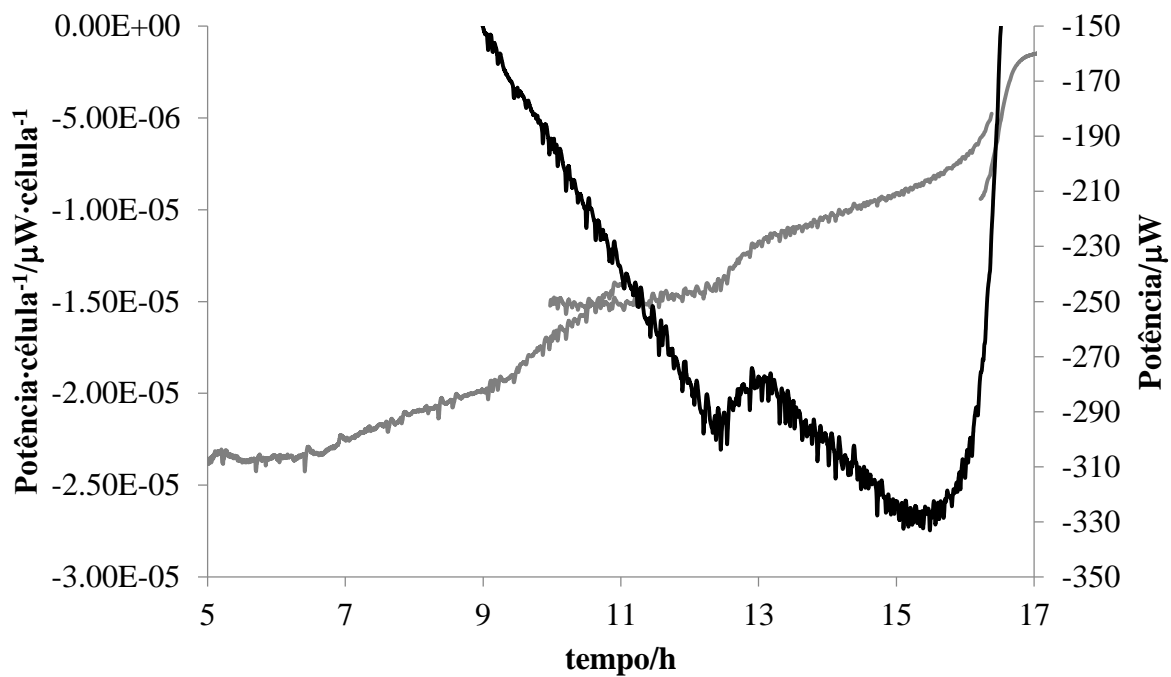


Figura 14. Comportamento oscilatório associado à potência dissipada total e por célula durante a fase exponencial e pós-diáuxica.

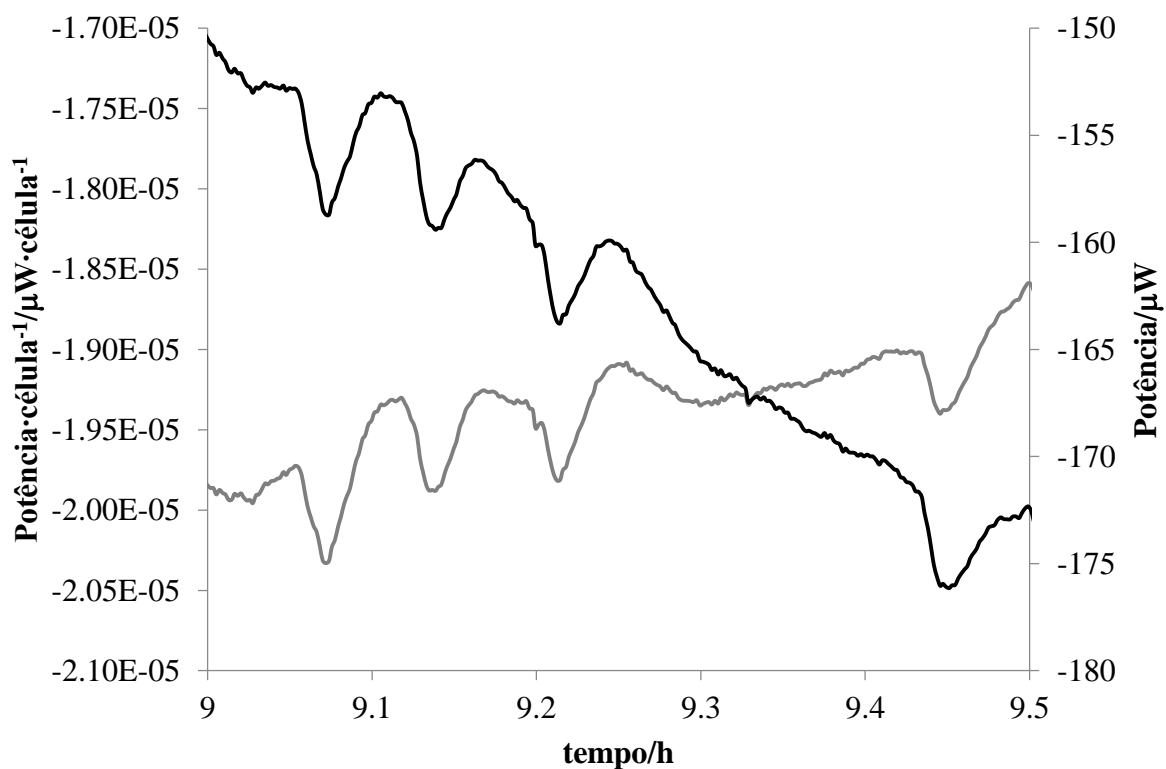


Figura 15. Comportamento oscilatório associado à potência dissipada total e por célula no período entre as 9 e as 9,5h da figura anterior.

Como se pode perceber, as oscilações detetadas estão associadas a uma reprodutibilidade baixa, pelo que não se aprofundou o seu estudo neste trabalho. No entanto, parece evidente que a amplitude de cada oscilação representa ~1-3 % do valor da potência dissipada por célula global. Além disso, observa-se um aumento da amplitude ao longo do tempo ao analisar-se as oscilações associadas à potência dissipada pela população celular, mas ao normalizar para o número de células, este valor diminui progressivamente. A frequência deste comportamento oscilatório, apesar de estar associado a um erro muito grande, aumenta ao longo do tempo.

3.2 Estudo da resposta da *S. cerevisiae* a adições bolus e a um estado estacionário de doses sub-letais de H₂O₂

No capítulo 3.2 estudou-se o impacto que o H₂O₂ tem sobre o metabolismo de culturas *batch* de *S. cerevisiae* no imediato e a longo prazo. Tentou-se associar a resposta calorimétrica observada com a conhecida resposta adaptativa deste microrganismo a doses sub-letais do oxidante em questão. Já se observou que a exposição da *S. cerevisiae* a H₂O₂ por adições bolus gera uma resposta celular diferente em relação a quando é exposta a uma concentração constante ao longo do tempo (Matias *et al.*, 2011). Assim, utilizaram-se estes dois métodos de exposição a este oxidante e estudaram-se as diferentes respostas que provocam.

3.2.1 Estudo da resposta imediata da *S. cerevisiae* ao H₂O₂

Começou-se por estudar o efeito imediato de doses sub-letais de H₂O₂ no metabolismo celular da *S. cerevisiae*. Na figura 16 estão representadas a potência dissipada pela população completa e por célula durante três adições bolus de 150 µM deste oxidante. Como se pode observar, a resposta imediata ao H₂O₂ é exotérmica uma vez que a potência dissipada aumenta. Note-se que a potência dissipada por célula diminui ao

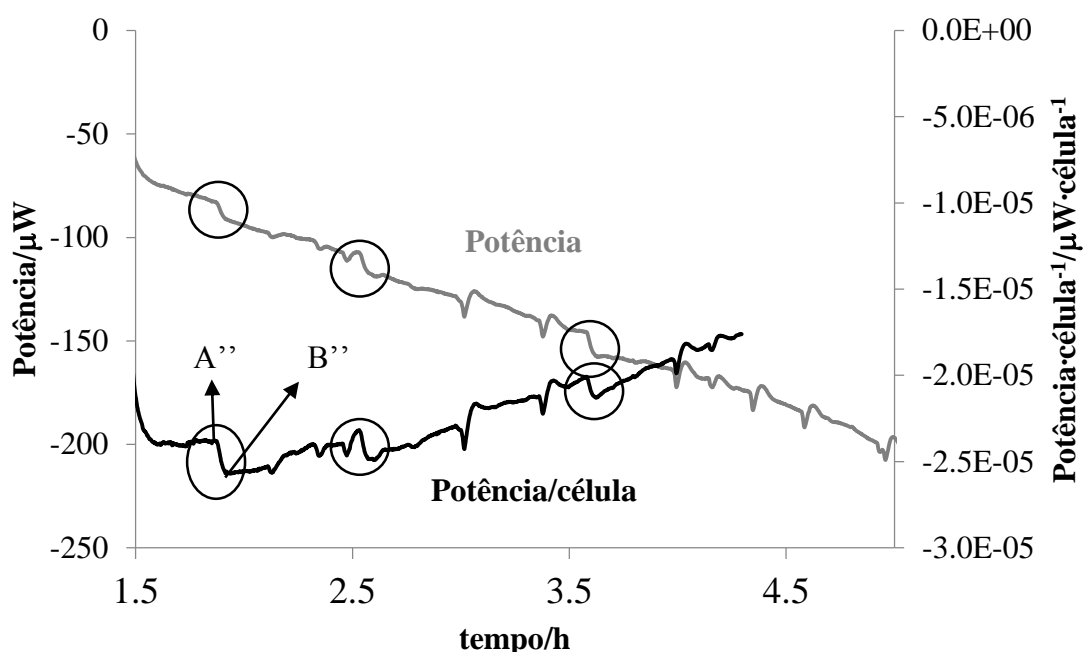


Figura 16. Efeito de três adições bolus de H₂O₂ na potência dissipada total e normalizada por célula. As adições de H₂O₂ estão assinaladas com os círculos e a linha clara representa a potência dissipada pela população celular, enquanto a escura consiste na potência dissipada por célula.

longo do tempo, uma vez que a exposição a este oxidante foi realizada durante a fase exponencial. No entanto, as adições de H₂O₂ causam aumentos momentâneos da potência dissipada por célula. Não se mostrou qual o efeito da exposição a uma dose estacionária deste oxidante porque o seu efeito imediato é idêntico ao de uma adição bolus, ou seja, observa-se um aumento momentâneo da potência dissipada pela população e por célula e depois estas retomam o seu comportamento normal.

Para analisar a resposta celular imediata ao H₂O₂ de uma forma quantitativa, determinaram-se os valores de potência associados às respostas imediatas detetadas ($\text{pJ} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). O seu cálculo fez-se pela reação descrita abaixo

$$\Delta P(\text{resposta imediata ao H}_2\text{O}_2) = P/\text{célula}(B'') - P/\text{célula}(A'') \quad (5)$$

em que $P/\text{célula}$ ($\text{pJ} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) em B'' e A'' correspondem aos valores de potência dissipada por célula imediatamente a seguir e antes da adição de H₂O₂, respetivamente

(ver figura 16). Essencialmente, esta potência consiste no calor libertado por célula por unidade de tempo. Os valores obtidos para os dois métodos de exposição estão representados no quadro 4. De maneira a perceber até que ponto o metabolismo da *S. cerevisiae* é desviado para a resposta ao H_2O_2 , fez-se o quociente entre a potência associada à resposta e o valor global de potência dissipada por célula no momento da adição. Não houve diferenças com significado estatístico entre nenhum valor de potência nem de metabolismo desviado para a resposta (nem entre adições bolus nem de bolus vs estado estacionário).

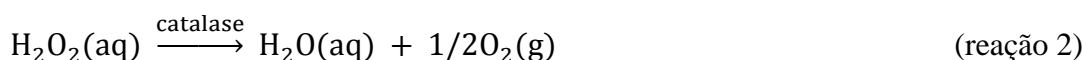
Quadro 4. Potência associada à resposta imediata ao H_2O_2 (ΔP) nas culturas de *S. cerevisiae* expostas a três adições bolus ou a uma dose estacionária (nos quadros A11 e A12 apresentam-se os valores individuais das experiências). São também apresentados os valores teóricos calculados para o consumo de H_2O_2 por catalase, citocromo c peroxidase (CCP) e por peroxirredoxinas (Prx) ou glutathione peroxidases (GPx) (ver texto para os cálculos).

	Adição bolus			Dose estacionária de H_2O_2
	1ª Adição	2ª Adição	3ª Adição	
ΔP /pJ·célula ⁻¹ ·s ⁻¹	-1,64±0,39 (n=5)	-1,66±0,12 (n=6)	-1,80±0,65 (n=6)	-1,83±0,54 (n=6)
% Metabolismo desviado para resposta ao H_2O_2	6,2±1,6 (n=6)	7,7±1,4 (n=6)	7,8±2,1 (n=5)	8,7±1,2 (n=5)
ΔP previsto/pJ·célula ⁻¹ ·s ⁻¹				
Catalase			-0,54	
Prx/GPx			-2,02	
CCP			-2,00	

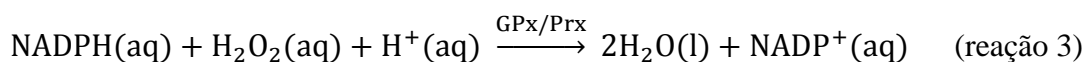
3.2.1.1 Cálculo teórico para a potência associada à resposta imediata da *S. cerevisiae* ao H_2O_2 e comparação com a experimental

Como já foi referido, quando a *S. cerevisiae* é exposta a uma dose suficiente deste oxidante para causar *stress* oxidativo, desencadeia uma resposta global, altamente complexa e multifatorial, afetando diversos processos celulares (Godon *et al.*, 1998, Pedroso *et al.*, 2012). Os catalases, peroxirredoxinas (Prx), glutathione peroxidases (GPx) e citocromo c peroxidases são alguns dos enzimas antioxidantes envolvidos na resposta

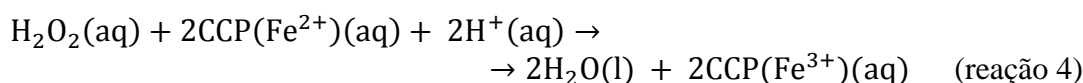
contra o *stress* oxidativo provocado pelo H₂O₂ em *S. cerevisiae* (Chance *et al.*, 1979, Minard & McAlister-Henn, 2001, Cyrne *et al.*, 2010). Estas enzimas catalisam as reações:



$$\Delta_r H / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{H}_2\text{O}_2 = -94,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$



$$\Delta_r H / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{H}_2\text{O}_2 = -355,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$



$$\Delta_r H / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{H}_2\text{O}_2 = -350,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

As entalpias de reação para as três reações foram calculadas a partir dos valores de entalpia de formação molar dos reagentes/produtos mostrados no quadro 5. Assumiu-se que o dador de eletrões da reação 4 é o NADH, apesar se poder haver outros.

De maneira a perceber qual o impacto que o consumo do H₂O₂ sobre a potência da resposta imediata mencionada anteriormente, foi-se prever qual seria o seu valor assumindo que o consumo era inteiramente dependente da reação 2, 3 ou 4. Para isso, determinou-se a velocidade de consumo de H₂O₂ por célula a partir da equação abaixo

$$v_{\text{consumo}} = \frac{k_{\text{consumo}} [\text{H}_2\text{O}_2]}{f_{\text{OD-células/L}}} \quad (6)$$

em que [H₂O₂] é a concentração molar de H₂O₂, v_{consumo} é velocidade de consumo por célula (mol·célula⁻¹·s⁻¹), k_{consumo} é a constante de consumo (s⁻¹·OD⁻¹) e $f_{\text{OD-células/L}} = 2,94 \times 10^{10}$ células·L⁻¹·OD₆₀₀⁻¹ (secção 3.1.2) é o fator de conversão de OD para células/L. A concentração de H₂O₂ associada à resposta imediata observada é 150×10^{-6} M. Assim, assumindo que $k_{\text{consumo}} = 0,067 \text{ min}^{-1} \cdot \text{OD}^{-1}$ (valor não publicado) para a estirpe de *S. cerevisiae* na fase exponencial (e nestas condições experimentais) obtém-se $v_{\text{consumo}} = 5,70 \times 10^{-18} \text{ mol} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Quadro 5. Entalpias de formação molar dos reagentes/produtos das reações catalisadas pelas catalases, citocromo c peroxidases e pelos glutathione peroxidases ou peroxirredoxinas em condições padrão. Dados de Alberty, 2003.

Reagente ou produto	$\Delta_f H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
H_2O_2 , aq	-191.99
H_2O , aq	-286.65
O_2 , g	0
H^+ , aq	0,41
NADP^+ , aq	-6,57
NAD^+ , aq	-10,26
NADPH , aq	-33,28
NADH , aq	-41,38

Multiplicando este valor pelas entalpias molares das reações 2, 3 e 4 acima indicadas obtém-se uma variação de potência igual a -0,54, -2,02 e -2,00 $\text{pJ} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respetivamente. O valor de potência previsto assumindo que os GPx e os Prx (reação 3) ou o CCP (reação 4) são os responsáveis pelo consumo do H_2O_2 é muito próximo do valor de potência obtido experimentalmente para a resposta imediata, que é $-1,73 \pm 0,45$ $\text{pJ} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (média \pm desvio-padrão das três adições bolus e da adição inicial das experiências de estado estacionário). O desvio entre estes valores é de 14 % tanto para a reação 3 como para a reação 4. Note-se que ambos os valores de potência previstos estão dentro do erro associado ao valor experimental, pelo que é possível que a resposta

imediate que se observa seja devido ao calor libertado associado ao consumo do H_2O_2 pelos GPx e Prx e/ou CCP. Uma característica importante do metabolismo deste oxidante é o seu rápido consumo quando adicionado ao meio de cultura (Chance *et al.*, 1979). O facto da variação de potência associada à resposta imediata, aparentemente, resultar do seu consumo é indicativo desta característica. O desvio para a reacção dos catalases é muito maior (69 %) e o valor previsto não está dentro do erro experimental, o que significa que é pouco provável que o catalase tenha um papel predominante no consumo deste oxidante, pelo menos na resposta imediata que se observa após este ser adicionado ao meio de cultura. Desta forma, aparentemente, os GPx e os Prx e/ou o CCP parecem ter uma importância relativa maior que o catalase para a resposta imediata contra o H_2O_2 . Esta observação é concordante com o facto de a ausência do catalase ter um impacto reduzido na resistência de células de *S. cerevisiae* não-adaptadas e em fase exponencial contra o stress oxidativo provocado por adições bolus deste oxidante (Izawa *et al.*, 1996). O valor de potência associado às respostas imediatas consiste em ~ 7-9 % do valor global energético celular nos momentos da adição, o que revela que o consumo do H_2O_2 tem um impacto grande no metabolismo no momento da exposição.

3.2.2 Mecanismo de resposta global da *S. cerevisiae* ao H_2O_2

Na secção anterior percebeu-se que a resposta imediata levada a cabo pela *S. cerevisiae* contra doses sub-letais de H_2O_2 resulta provavelmente da sua reacção de consumo catalisada por GPx e Prx e/ou do CCP. O passo seguinte foi estudar os efeitos a longo prazo que estas doses de H_2O_2 provocam sobre o metabolismo celular deste microrganismo. De modo a atingir este objetivo, fez-se uma descrição das curvas *P-t* para as culturas expostas a adições bolus e em estado estacionário deste oxidante. Os valores

Quadro 6. Descrição das curvas P - t , para as culturas controlo e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H_2O_2 (ver replicados individuais nos quadros A5, A6 e A7). Para o significado de cada parâmetro ver figura 8. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Parâmetro	Controlo	Adições bolus	Dose estacionária
$t_{\text{transição diáuxica}}/h$	$11,8 \pm 0,8$ (n=7)	$11,3 \pm 0,9$ (n=6)	$11,3 \pm 0,2$ (n=6)
$P_{\text{máximo}}/\mu W$	324 ± 9 (n=6)	$280 \pm 10^{**}$ (n=5)	$290 \pm 20^{**}$ (n=6)
$P_{\text{transição diáuxica}}/\mu W$	304 ± 17 (n=6)	$257 \pm 20^{**}$ (n=5)	309 ± 10 (n=5)
$P_{\text{fase estacionária}}/\mu W$	36 ± 5 (n=4)	$9,6 \pm 5,9^{**}$ (n=4)	42 ± 8 (n=5)
$P_{\text{fase lag}}/\mu W$	$3,6 \pm 1,4$ (n=7)		
Duração da fase pós-diáuxica/h	$4,8 \pm 0,3$ (n=6)	$4,7 \pm 0,4$ (n=5)	$5,0 \pm 0,2$ (n=5)
$\text{Área}_{\text{fase lag-pós-diáuxica}}/J$	$4,2 \pm 0,3$ (n=6)	$3,4 \pm 0,1^{**}$ (n=5)	$4,0 \pm 0,2$ (n=5)
$\text{Área}_{\text{fase lag-estacionária}}/J$	$8,8 \pm 0,3$ (n=7)	$7,0 \pm 0,3^{**}$ (n=5)	$8,7 \pm 0,4$ (n=5)

Nota: Corrigiu-se os valores associados à integração das curvas para testar se o calor libertado associado às reações de consumo do H_2O_2 (exotérmico) afeta o calor obtido pela integração. A correção consistiu em subtrair o calor associado ao consumo do H_2O_2 adicionado assumindo que é todo consumido pela reação catalisada pelos catalases (reação 2), pelos GPx e Prx (reação 3) ou pelo CCP (reação 4). Observou-se que o calor total libertado associado ao consumo de H_2O_2 é desprezável quando se fazem as integrações, uma vez que os valores obtidos tiveram um desvio entre ~ 1% (reação do catalase) e ~ 3% (reação do GPx/Prx).

obtidos para os parâmetros analisados (incluindo para as culturas controlo) estão representados no quadro 6.

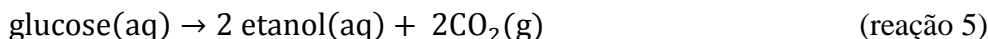
Analisando o quadro 6, percebe-se que a exposição das células de *S. cerevisiae* a doses sub-letais de H_2O_2 provoca uma série de alterações com significado estatístico na curva P - t obtida em relação à curva de controlo. Além disso, os efeitos dependem do modo de exposição (bolus ou estado estacionário), como seria expectável. A potência dissipada no momento da transição diáuxica das populações expostas às adições bolus ($257 \pm 20 \mu W$) é cerca de 15 % inferior ao valor das culturas controlo ($304 \pm 17 \mu W$). Note-se que se assumiu que a transição diáuxica ocorre quando se atinge o primeiro máximo da curva P - t para facilitar o tratamento dos dados, apesar de esta ocorrer antes. O máximo prévio à

entrada na fase estacionária das culturas expostas às adições bolus ($280 \pm 10 \mu\text{W}$) e à dose estacionária ($290 \pm 20 \mu\text{W}$) são 14 e 10 % inferiores ao das culturas controlo, respetivamente ($324 \pm 9 \mu\text{W}$). O valor de potência dissipada na linha de base associada à fase estacionária das culturas expostas a adições bolus ($9,6 \pm 5,9 \mu\text{W}$) é cerca de 73 % inferior ao das culturas controlo ($36 \pm 5 \mu\text{W}$). A exposição a um estado estacionário de H_2O_2 , aparentemente, tem um impacto menor que as adições bolus, uma vez que apenas a potência dissipada no máximo prévio à fase estacionária é afetada.

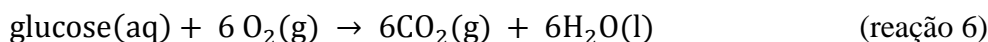
Uma vez que se observaram diferenças com significado estatístico nos valores de potência dissipada no final da fase exponencial e da pós-diáuxica, analisou-se se o calor total libertado pelas culturas expostas ao H_2O_2 em relação às culturas controlo. Assim, integraram-se as várias curvas $P-t$ do início da fase lag até ao pico que se segue à transição diáuxica e até se atingir a linha de base associada à fase estacionária (de novo, para simplificar o processo da integração). Como se pode observar, ainda no quadro 6, o calor libertado nas culturas expostas às adições bolus até à mudança diáuxica ($3,4 \pm 0,1 \text{ J}$) e ao final da fase pós-diáuxica ($7,0 \pm 0,3 \text{ J}$) é significativamente inferior (aproximadamente 20 %) em relação às culturas controlo ($4,2 \pm 0,3 \text{ J}$ e $8,8 \pm 0,3 \text{ J}$, respetivamente). Pelo contrário, culturas expostas a uma dose estacionária de H_2O_2 libertam sensivelmente o mesmo calor que as culturas controlo nos dois momentos referidos. Esta última observação é inesperada uma vez que a potência dissipada no final da fase pós-diáuxica foi significativamente diferente da associada às culturas controlo, como já se mencionou previamente. É importante referir que o calor libertado associado ao consumo direto do H_2O_2 não afeta o calor obtido pela integração das curvas (ver nota do quadro 6).

A partir das áreas de secções específicas do termograma das curvas descritas anteriormente, pode-se obter, por exemplo, as entalpias de oxidação da glucose a etanol

(fluxo de calor até a transição diáuxica) ou da oxidação completa da glucose (fluxo de calor até a fase estacionária) descritas pelas reações:



$$\Delta_r H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{glucose} \sim -101,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$



$$\Delta_r H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{glucose} \sim -2813,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

As entalpias de reação foram calculadas a partir dos valores de entalpia de formação molar nas condições padrão de cada um dos reagentes/produtos referidos, consistindo em valores teóricos. No quadro 7 estão representados os valores experimentais obtidos para as culturas controle, expostas a adições bolus e a uma dose estacionária de H_2O_2 . Como era esperado, as entalpias associadas ao consumo de glucose das culturas expostas a adições bolus ($-77 \pm 3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ de glucose) são significativamente menores que as das culturas controle ($-96 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), enquanto as das culturas expostas a uma dose estacionária ($-90 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) não são estatisticamente diferentes das culturas controle.

Note-se que o valor de entalpia obtido para o consumo fermentativo de glucose pelas culturas controle, $-96 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ de glucose, é muito próximo do teórico (reação 5), que é de $-101 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ que, aliás, está dentro do erro experimental. Já o valor de entalpia para a oxidação completa da glucose ($-200 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) é cerca de 14 vezes mais pequeno que o teórico (reação 6), que é de $-2813,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Isto deve-se provavelmente à evaporação do etanol da cultura, pelo que não se vai ter em conta as oxidações completa da glucose e do etanol na análise dos resultados.

A modificação das entalpias associadas ao consumo de glucose sugere que as culturas de *S. cerevisiae* respondem a adições bolus de H_2O_2 alterando o seu metabolismo catalítico da glucose na fase exponencial (redução de 20 % em relação ao controle). A

deteção desta alteração do metabolismo levada a cabo pela *S. cerevisiae* seria expectável dado a alteração metabólica a larga escala que ocorre quando exposta a adições bolus ou a uma dose estacionária de H_2O_2 (Cyrne *et al.*, 2003, Cyrne *et al.*, 2010, Dormer *et al.*, 2002, Matias *et al.*, 2007, Pedroso *et al.*, 2009, Godon *et al.*, 1998, Pedroso *et al.*, 2012, Folmer *et al.*, 2007, Branco *et al.*, 2004, Zakrzewska *et al.*, 2011). Pelo contrário, a exposição a uma dose estacionária sub-letal de H_2O_2 não parece alterar o metabolismo da glucose, o que é inteiramente inesperado. Estas observações deixam claro que a resposta metabólica contra o *stress* oxidativo induzido por este oxidante é muito dependente do seu modo de exposição à cultura.

Quadro 7. Entalpia de oxidação da glucose a etanol e completa para as culturas controlo e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H_2O_2 . A integração da curva de diferença de potencial em função do tempo foi feita do início da fase lag à transição diáuxica e até a fase estacionária. A constante de calibração usada foi de $15,49 \mu W \cdot \mu V^{-1}$ e a quantidade de glucose foi de $4,40 \times 10^{-5}$ mol (ver quadros A13, A14, A15, A5, A6 e A7 para os replicados individuais). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Culturas	Oxidação da glucose a etanol		Oxidação completa da glucose	
	Q/J	$\Delta_r H / kJ \cdot mol^{-1}$ de glucose	Q/J	$\Delta_r H / kJ \cdot mol^{-1} \cdot glucose$
Culturas controlo	$-4,2 \pm 0,3$ (n=6)	-96 ± 7 (n=6)	$-8,8 \pm 0,3$ (n=7)	-200 ± 7 (n=7)
Culturas com adições bolus de H_2O_2	$-3,4 \pm 0,1^{**}$ (n=6)	$-77 \pm 3^{**}$ (n=6)	$-7,0 \pm 0,3^{**}$ (n=5)	$-159 \pm 7^{**}$ (n=5)
Culturas expostas ao estado estacionário de H_2O_2	$-4,0 \pm 0,2$ (n=5)	-90 ± 4 (n=5)	$-8,7 \pm 0,4$ (n=5)	-198 ± 9 (n=5)

Quadro 8. Análise do efeito do H_2O_2 sobre o crescimento celular a partir dos μ da fase exponencial, em culturas preparadas a partir da mesma cultura inicial, isto é, as amostras são emparelhadas (ver quadros A16 e A17 para os replicados individuais). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Culturas	μ/h^{-1} – cultura controlo	μ/h^{-1} – cultura exposta a H_2O_2
adições bolus	$0,44 \pm 0,03$ (n=15)	$0,42 \pm 0,03^{**}$ (n=15)
Estado estacionário	$0,44 \pm 0,03$ (n=7)	$0,42 \pm 0,04^*$ (n=7)

Para complementar a resposta observada por calorimetria, compararam-se também as taxas de crescimento (associadas ao número de células) da fase exponencial das culturas expostas a H_2O_2 com as das culturas controlo (quadro 8). O *stress* oxidativo causado pela adição deste oxidante por ambos os métodos provoca uma redução com significado estatístico da taxa de crescimento de cerca de 4 %. Desta forma, deteta-se o compromisso globalmente aceite que existe entre a resposta a *stresses* e o crescimento celular (Godon *et al.*, 1998, Zakrzewska *et al.*, 2011), uma vez que em ambos os casos se gera uma resposta contra o H_2O_2 . No entanto, este costuma ter uma magnitude muito maior que o obtido neste trabalho. Possivelmente, porque geralmente é observado para *stresses* mais severos que o analisado neste estudo. Assim, o facto da entalpia associada ao consumo de glucose durante a fase exponencial reduzir ~ 20 %, mas a taxa de crescimento apenas ~ 4 % para as culturas expostas a adições bolus de H_2O_2 foi bastante surpreendente porque se esperaria que uma redução tão grande na entalpia da glucose tivesse algum impacto no crescimento celular no final da fase exponencial. Aparentemente, a *S. cerevisiae* é capaz de responder de forma a resistir aos efeitos tóxicos do H_2O_2 mantendo, praticamente, o investimento na proliferação celular (apesar da pequena redução detetada). Neste sentido, o caso das culturas expostas a uma dose estacionária de H_2O_2 não é tão surpreendente dado que se observa que aparentemente o consumo da glucose não é significativamente alterado, não havendo, por isso, razão para um desinvestimento na divisão celular.

De qualquer forma, os estes dados são concordantes com esta visão de que a resposta a *stresses* exige um desvio de energia e outros recursos para a remodelação metabólica necessária para a sobrevivência nestas condições, apesar de a uma escala muito menor que a usual.

3.2.3 Efeito do H₂O₂ sobre o aproveitamento energético para a divisão celular ao longo do crescimento

Como já se mencionou, existe um compromisso globalmente aceite entre a resposta a *stresses* e o crescimento celular (Godon *et al.*, 1998, Zakrzewska *et al.*, 2011). Desta forma, analisou-se o aproveitamento energético para a divisão celular da *S. cerevisiae* para as culturas expostas ao *stress* oxidativo provocado pelo H₂O₂. Nos quadros 9, 10 e 11 estão representadas os valores das taxas de crescimento associadas às várias fases de crescimento, as velocidades da variação da potência dissipada e os aproveitamentos energéticos para a divisão celular para os períodos descritos na figura 13 e no quadro 3 das culturas controlo, expostas a adições bolus e a uma dose estacionária deste oxidante.

Nesta experiência não foi possível detetar as diferenças estatisticamente significativas para a taxa de crescimento da fase exponencial entre culturas expostas ao H₂O₂ em comparação com o controlo, contrariamente ao que se observou em 3.2.2. Esta observação é justificada pelo facto de, nesta secção, se realizar uma comparação de forma não-pareada ao contrário do que se fez em 3.2.2. No entanto, observou-se que a taxa de crescimento da fase pós-diáuxica das culturas expostas a uma dose estacionária de H₂O₂ ($0,263 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$) é significativamente alterada em relação ao controlo ($0,177 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$).

Quadro 9. Taxas de crescimento para as várias fases de crescimento das culturas controlo e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H₂O₂ (ver replicados individuais nos quadros A8, A9 e A10). * p<0,05, ** p<0,01

Fase de crescimento	μ_{OD}/h^{-1}		
	Controlo	Adições bolus	Dose estacionária
Lag (A)	0,053±0,043 (n=5)	————	0,040±0,032 (n=4)
Exponencial (B)	0,416±0,027 (n=6)	0,427±0,015 (n=5)	0,418±0,027 (n=5)
Pós-diáuxica (C)	0,177±0,015 (n=5)	————	0,263±0,012** (n=3)

Quadro 10. Velocidade da variação da potência dissipada para os períodos descritos na figura 13 e no quadro 3 das culturas controlo e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H₂O₂ (ver replicados individuais nos quadros A8, A9 e A10). * p<0,05, ** p<0,01

Fase de crescimento	Períodos analisados (ln(-V))		$\mu_{calorimetria}/h^{-1}$		
			Controlo	Adições bolus	Dose estacionária
Lag (A)	A'	Lag	0,93±0,25 (n=6)	————	1,16±0,18 (n=2)
Exponencial (B)	B'	Exponencial	0,33±0,02 (n=7)	0,34±0,04 (n=4)	0,34±0,02 (n=5)
	C'	Final da exponencial	0,197±0,016 (n=5)	0,221±0,007* (n=4)	0,215±0,048 (n=6)
Pós-diáuxica (C)		Início da pós-diáuxica			
	D'	Pós-diáuxica	0,065±0,01 (n=5)	0,082±0,008* (n=4)	0,056±0,011 (n=5)

Quadro 11. Aproveitamento energético para a divisão celular para os períodos descritos na figura 13 e no quadro 3 das culturas controlo e expostas a adições bolus ou a uma dose estacionária de H₂O₂ (ver replicados individuais nos quadros A8, A9 e A10). * p<0,05, ** p<0,01

Fase de crescimento	Períodos analisados (ln(-V))		Aproveitamento energético para divisão celular		
			(μOD / μcalorimetria)		
			Controlo	Adições bolus	Dose estacionária
Lag (A)	A'	Lag	0,071±0,043 (n=4)	————	0,084±0,027 (n=2)
Exponencial (B)	B'	Exponencial	1,15±0,06 (n=5)	1,27±0,12 (n=5)	1,20±0,14 (n=5)
	C'	Final da exponencial	2,26±0,09 (n=4)	1,93±0,08** (n=5)	2,15±0,38 (n=5)
Pós-diáuxica (C)		Início da pós-diáuxica	0,91±0,12 (n=5)	————	1,12±0,04 (n=2)
	D'	Pós-diáuxica	2,98±0,55 (n=4)	————	4,03±2,09 (n=3)

Por análise do quadro 10, observa-se que a velocidade de variação da potência dissipada dos períodos C' e D' (na figura 13 é representado o significado de cada período) das culturas expostas a adições bolus de H₂O₂ são significativamente mais altos que os das culturas controlo. No entanto, devido ao procedimento experimental adotado, só foi possível obter o aproveitamento energético para o ciclo de divisão celular para a fase exponencial e para o final da fase exponencial. No quadro 11 observa-se que o desvio energético para a divisão celular durante o período final da fase exponencial (1,93±0,08)

decrece ~ 15 % com a exposição a adições bolus de H₂O₂ em relação ao controlo (2,26±0,09).

No caso das culturas expostas a uma dose estacionária de H₂O₂, nenhum dos aproveitamentos energéticos é afetado em relação às culturas controlo (quadro 11). Esta observação é concordante com o baixo efeito que a exposição ao H₂O₂ por este método apresenta sobre o calor libertado pelas culturas de *S. cerevisiae*. Além disso, como já se mencionou, adições bolus deste oxidante provocam uma redução do aproveitamento energético do período final da fase exponencial, o que é concordante com a visão de que adições bolus causam um *stress* maior que a exposição a uma dose estacionária. Como já se mencionou, a taxa de crescimento da fase pós-diáuxica das culturas expostas à dose estacionária (0,263±0,012 h⁻¹) aumenta ~ 33 % em relação à das culturas controlo (0,177±0,015 h⁻¹). Esta observação permite especular que o *stress* oxidativo associado à exposição a uma dose estacionária de H₂O₂, de alguma forma, favorece a proliferação celular durante a fase pós-diáuxica. Nesta fase, o metabolismo respiratório torna-se predominante sobre a glicólise (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2005, Lamprecht, 2003), estando, por isso, associado a uma maior produção de EROs. Deste modo, a adaptação prévia pela exposição a uma dose estacionária de ~ 150 µM de H₂O₂ poderá levar a que parte da resposta metabólica associada à transição diáuxica já tenha sido efetuada.

Dado que a taxa de crescimento associada à fase pós-diáuxica é aumentada com a exposição à dose estacionária de H₂O₂, procurou-se perceber se havia alterações ao nível do número de células no momento da transição diáuxica e no início da fase estacionária. No quadro 12 pode observar-se que a exposição à dose estacionária de H₂O₂ levou a um aumento significativo de ~ 20% do número de células no início da fase estacionária, apesar de ser semelhante no momento da transição diáuxica. Esta observação deverá resultar da maior taxa de crescimento que apresenta durante a fase pós-diáuxica. Assim, caso se

analise o ciclo celular completo, a exposição a uma dose estacionária de H_2O_2 induz adaptação e simultaneamente um aumento da proliferação celular, o que contradiz o compromisso entre proliferação e resistência ao *stress* usualmente assumido na literatura.

Quadro 12. Densidade ótica determinada na transição diáuxica e no início da fase estacionária (ver quadro A18 para replicados individuais). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Culturas controlo		Culturas expostas a adições bolus de H_2O_2	Culturas expostas a uma dose estacionária de H_2O_2	
OD ₆₀₀ (fase estacionária)	OD ₆₀₀ (transição diáuxica)	OD ₆₀₀ (fase estacionária)	OD ₆₀₀ (fase estacionária)	OD ₆₀₀ (transição diáuxica)
3,7±0,3 (n=6)	1,8±0,2 (n=6)	3,5±0,1 (n=4)	4,6±0,4** (n=4)	1,9±0,3 (n=4)

4. Discussão e Conclusões

4.1 A transição diáuxica não é detetada imediatamente por calorimetria

A aplicação da calorimetria ao estudo do crescimento de microrganismos baseia-se no facto do seu metabolismo consistir numa série de processos que são acompanhados pela libertação ou consumo de calor. Desta forma, medir o fluxo de calor associado a estes processos é uma forma adequada de analisar o metabolismo celular durante o crescimento (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Larsson *et al.*, 1993, Li *et al.*, 1999). O crescimento de culturas líquidas de *S. cerevisiae*, assim como de outros microrganismos (ex: *E. coli*), já, por diversas vezes, foi acompanhado por calorimetria com a glucose como fonte de carbono e energia, em condições aeróbias e em *batch* (Lamprecht, 2003, Brettel *et al.*, 1972, Higuera-Guisset *et al.*, 2005). As curvas *P-t* típicas descritas na literatura (ver a descrição na secção 1.3.2) são muito parecidas com as obtidas neste trabalho. No entanto, estas foram interpretadas de forma diferente da usual encontrada na literatura. Até hoje, pensou-se que o primeiro máximo da curva *P-t* e o decréscimo da potência dissipada que se lhe segue (ver figura 7) estavam associados à transição diáuxica e à remodelação

metabólica que lhe está relacionada (Braissant *et al.*, 2013, Braissant *et al.*, 2010, Schaarschmidt & Lamprecht, 1978). Neste trabalho, pelo contrário, observou-se que a transição diáuxica se inicia quase duas horas antes de se atingir o primeiro pico de potência dissipada. Deste modo, após o início deste fenómeno, o ritmo com que a potência dissipada aumenta mantém-se aproximadamente igual, enquanto a taxa de crescimento sofre a redução que lhe está associada. Como já é conhecido, este fenómeno exige uma alta atividade metabólica devido à transição do consumo da glucose por um metabolismo essencialmente fermentativo (Slavov *et al.*, 2014, Longo *et al.*, 1996, Werner-Washburne *et al.*, 1996, Brauer *et al.*, 2005, Lamprecht, 2003) para o consumo do etanol acumulado na fase exponencial (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2005, Larsson *et al.*, 1993) por um metabolismo fundamentalmente respiratório (Brauer *et al.*, 2005, Lamprecht, 2003). Assim, a manutenção do ritmo com que a potência dissipada aumenta durante a transição diáuxica poderá resultar desta alta atividade metabólica associada à reprogramação global (Gasch *et al.*, 2000, Brauer *et al.*, 2005) que ocorre nesse momento.

É importante referir que, por vezes, surgem curvas de crescimento acompanhadas por calorimetria com algumas diferenças em relação à curva típica descrita anteriormente. Já se observou um pico abrupto a seguir à fase estacionária, ou seja, um aumento e decréscimo rápidos da potência dissipada (Roy & Samson, 1988), que não foi detetado neste trabalho. Como já se mencionou, as curvas *P-t* realizadas nas condições deste trabalho são bifásicas, havendo um pico associado ao consumo da glucose e outro associado ao consumo do etanol. Outros autores obtiveram um pico associado ao consumo do etanol muito superior que o do consumo da glucose (Schaarschmidt & Lamprecht, 1978), tendo observado um valor de potência dissipada no segundo máximo da curva *P-t* quase duas vezes maior que o do primeiro (ver figura 7), ao contrário do que se observou neste trabalho. Esta diferença no que foi aqui observado, possivelmente, dever-se-á à

evaporação do etanol da cultura sob as condições experimentais em que se realizou este trabalho, pois o valor de entalpia obtido experimentalmente para a oxidação completa da glucose ($-200 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ de glucose) foi cerca de 14 vezes mais pequeno que o teórico (quadro 7).

4.2 O metabolismo celular da *S. cerevisiae* é altamente dinâmico durante todo o seu crescimento

Já havia sido proposto que a potência dissipada por célula varia ao longo do crescimento de microrganismos (Braissant *et al.*, 2013, Higuera-Guisset *et al.*, 2005). Aliás, alguns autores obtiveram valores de potência dissipada por célula ou por biomassa observando que esta não é constante, mas apenas em certos momentos e não ao longo de todo o crescimento (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2009). No entanto, na maior parte dos estudos em que a calorimetria é aplicada à análise de microrganismos avalia-se apenas a potência dissipada pela população celular e, muitas vezes, assume-se que cada fase de crescimento tem uma potência dissipada por célula constante (Higuera-Guisset *et al.*, 2005, Braissant *et al.*, 2013, Hashimoto & Takashi, 1982). Ao identificar esta lacuna no conhecimento atual, foi-se determinar a curva de potência dissipada por célula ao longo do crescimento da *S. cerevisiae* (figura 11), descrita em 3.1.2. As suas características mais marcantes são: (i) o valor de potência dissipada por célula varia continuamente ao longo do crescimento, inclusive dentro de cada fase; (ii) a fase lag está associada ao maior valor de potência dissipada por célula; (iii) após se atingir o seu valor máximo, este decresce continuamente ao longo do crescimento, exceto durante cerca de duas horas após o início da fase pós-diáuxica.

O facto do valor de potência por célula se modificar continuamente é coerente com a informação existente na literatura sobre o metabolismo da *S. cerevisiae*, em que se defende que este se encontra num ajuste contínuo ao longo do tempo e não num estado

estático (Slavov *et al.*, 2014). Observou-se que, durante a fase exponencial da *S. cerevisiae*, o consumo de O₂ decresce (Slavov *et al.*, 2014, Brauer *et al.*, 2005), tal como a produção de ATP por célula (Slavov *et al.*, 2014) e a resistência a *stress* térmico e oxidativo (Slavov *et al.*, 2014). Estas modificações metabólicas são acompanhadas de uma remodelação proteômica, transcriptômica e do padrão de modificações pós-traducionais constante, revelando que esta fase é altamente dinâmica em termos do seu metabolismo apesar da sua taxa de crescimento não se alterar (Slavov *et al.*, 2014).

A fase lag e o início da fase pós-diáuxica são os únicos períodos em que a potência dissipada por célula aumenta. Estes dois períodos estão associados a uma grande remodelação metabólica que tem um alto impacto no transcriptoma e proteoma celulares e afeta múltiplos processos celulares (Gasch *et al.*, 2000, Brauer *et al.*, 2005, Rolfe *et al.*, 2012, Haurie *et al.*, 2001, Brejning *et al.*, 2005, Brejning *et al.*, 2003), exigindo, por isso, uma atividade metabólica celular alta. Pensa-se que esta será a justificação para esta observação experimental. De acordo com esta interpretação, torna-se evidente que a reprogramação metabólica que a célula executa na fase lag tem uma magnitude muito superior que a da transição diáuxica, como era esperado (ver 3.1.2). Assumindo que a remodelação metabólica associada à fase pós-diáuxica decorre durante o período em que a curva de potência dissipada por célula está no patamar da região C da figura 11, é de salientar que o final da remodelação metabólica ocorre simultaneamente com o máximo da potência dissipada que se segue à transição diáuxica. Esta observação contradiz totalmente a ideia de que o primeiro máximo da curva *P-t* e o decréscimo da potência dissipada que se lhe segue estão associados à transição diáuxica e à sua remodelação metabólica (Braissant *et al.*, 2013, Braissant *et al.*, 2010, Schaarschmidt & Lamprecht, 1978), uma vez que, de acordo com esta interpretação, o final da remodelação metabólica ocorre precisamente quando se atinge o primeiro máximo de potência dissipada.

Doskey *et al.* propuseram um novo método de doseamento em experiências onde se testa o efeito de uma determinada substância sobre uma população celular, que consiste na normalização do número de moles ou massa da substância por célula (Doskey *et al.*, 2015). De seguida, mostram várias situações em que esta normalização se revela muito mais informativa que a tradicional normalização por volume de cultura. Os dados apresentados neste trabalho estão de acordo com esta ideia, uma vez que o perfil da curva $P-t$ é completamente diferente do perfil da curva de potência dissipada por célula. Além disso, o tipo de informação que se tira das duas curvas é totalmente diferente, apesar de se complementarem. Efetuar este tipo de análise em vários tipos de células diferentes poder-se-á revelar muito útil, por exemplo, no estudo do metabolismo de células cancerosas.

4.3 A distribuição energética entre os vários processos celulares não é constante durante o crescimento da *S. cerevisiae*

Até agora, pensou-se que a potência dissipada é diretamente proporcional ao número de células durante certos períodos do crescimento, por exemplo, durante a fase exponencial (Lamprecht, 2003, Roy & Samson, 1988, Hashimoto & Takashi, 1982). No entanto, já era conhecido que esta proporcionalidade não é mantida durante toda a curva de crescimento (Braissant *et al.*, 2013, Hashimoto & Takashi., 1982) como acontece no início da fase pós-diáuxica (potência dissipada diminui enquanto o número de células aumenta) ou na estacionária (tem o número de células máximo, enquanto que a potência dissipada se encontra quase ao nível da linha de base). Neste trabalho, como já se referiu, observa-se que a potência por célula se altera continuamente ao longo do crescimento. A existência de porções da curva de crescimento em que a potência dissipada varia de forma linear com o número de células implicaria que nessas zonas a potência dissipada por célula fosse constante, o que nunca é observado. Assim, em parte nenhuma da curva de

crescimento, nem sequer na fase exponencial, há uma proporcionalidade direta entre os dados calorimétricos e o número de células, ao contrário do que geralmente se assume. Desta forma, é necessário ter uma nova visão quando se utiliza a calorimetria para estudar o metabolismo celular e repensar se o acompanhamento de apenas a potência dissipada, por exemplo, em estudos do efeito de *stresses* sobre populações celulares é suficiente para obter resultados conclusivos acerca da percentagem de sobrevivência celulares, entre outros.

O facto da potência por célula variar continuamente resulta da relação entre o ritmo da potência dissipada e a taxa de crescimento celular variar durante o crescimento, inclusive dentro de cada fase. Assim, tornou-se claro que o desvio energético para a divisão celular não é constante. Calculou-se um parâmetro adimensional relativo ao desvio do conteúdo total energético para a divisão celular para observar este fenómeno experimentalmente. Resumidamente, a fase lag está associada ao menor desvio energético para a divisão celular, o que provavelmente se deve ao direccionamento metabólico para a adaptação ao meio de cultura. Segue-se o período inicial da fase pós-diáuxica, com um aproveitamento energético para a divisão celular 92% superior ao da fase lag. Ainda assim, o facto de ser o único período em que o ritmo da potência dissipada é maior que o da taxa de crescimento (ver 3.1.3) em conjunto com a fase lag, é indicativo da remodelação metabólica associada à transição diáuxica. Estes resultados são altamente concordantes com a informação obtida a partir da potência dissipada por célula, uma vez que permitem a mesma interpretação. Concluiu-se também que a fase pós-diáuxica distribui uma maior percentagem da energia disponível para a divisão celular que a fase exponencial. Esta observação suporta a ideia de que o metabolismo da fase exponencial da *S. cerevisiae* não parece estar associado ao crescimento mais eficiente, mas àquele que melhor favorece a proliferação celular rápida (Slavov *et al.*, 2014). Revela também que o metabolismo

fermentativo facilita a proliferação celular rápida, uma vez que está associado à maior taxa de crescimento, apesar de estar ter um consumo menos eficiente da glucose presente no meio que o metabolismo respiratório, reconhecidamente mais eficiente que o fermentativo (Slavov *et al.*, 2014, Zhao *et al.*, 2011, Macintyre & Rathmell, 2013, López-Lázaro, 2008). Esta conclusão tem um alto impacto no metabolismo da *S. cerevisiae* e de outros tipos de células proliferativas, como as cancerosas, uma vez que a razão do favorecimento do metabolismo fermentativo da glucose em relação ao respiratório mesmo com disponibilidade de O₂ tem sido alvo de vários estudos (Slavov *et al.*, 2014, Zhao *et al.*, 2011, Macintyre & Rathmell, 2013, López-Lázaro, 2008). Aparentemente, estas observações suportam a ideia (e todas as hipóteses derivadas desta premissa) que células proliferativas favorecem o metabolismo fermentativo da glucose porque permite um crescimento celular mais rápido, apesar de o custo em termos de glucose ser superior.

4.4 O metabolismo de células de *S. cerevisiae* é diferentemente afetado pelo H₂O₂ administrado por adições bolus vs por uma dose estacionária

4.4.1 Efeito do H₂O₂ no metabolismo catalítico da glucose

O tratamento de células de *S. cerevisiae* no início da fase exponencial com uma dose sub-letal de 150 µM administrada por uma adição bolus ou por um estado estacionário durante 90 min é capaz de induzir uma resposta adaptativa (Folmer *et al.*, 2008, Zakrzewska *et al.*, 2011). Esta é uma resposta global com impacto em vários processos celulares afetando o proteoma, transcriptoma e padrão de modificações pós-traducionais por vários mecanismos celulares (ex: alterações da eficiência de tradução proteica, da velocidade de transcrição e tradução, da velocidade de degradação proteica e de mRNAs) (Pedroso *et al.*, 2012, Cyrne *et al.*, 2003, Cyrne *et al.*, 2010, Dormer *et al.*, 2002, Matias *et al.*, 2007, Pedroso *et al.*, 2009, Godon *et al.*, 1998, Folmer *et al.*, 2007, Branco *et al.*, 2004, Zakrzewska *et al.*, 2011). Neste trabalho, avaliou-se o efeito destas

respostas no sinal calorimétrico e nalguns parâmetros que permitem tirar ilações acerca do metabolismo celular (área do termograma ou de zonas específicas e a potência dissipada máxima), mas que raramente são obtidos em estudos de *stress* causados pela adição de substâncias exógenas.

A exposição das culturas de *S. cerevisiae* a três adições bolus de 150 μM de H_2O_2 causou uma redução de 20 % da entalpia associada à fermentação da glucose (do calor libertado da fase lag à transição diáuxica) acompanhada de uma redução de 4 % da taxa de crescimento durante a fase exponencial em relação ao controlo. Estas observações revelam a alteração metabólica associada à resposta celular contra este *stress* oxidativo. Godon *et al.* observaram que parte da resposta a adições bolus 200 e 400 μM envolve uma remodelação proteica global, que parece favorecer um desvio do consumo de glucose pela via fermentativa para a via dos fosfatos de pentose (Godon *et al.*, 1998). Se isto também for verdade para adições de 150 μM , então a redução da entalpia da fermentação da glucose poder-se-á dever à redução do seu consumo por esta via.

Surpreendentemente, a exposição a uma dose estacionária sub-letal de H_2O_2 não parece alterar o metabolismo da glucose, apesar de ter o mesmo efeito que as adições bolus na taxa de crescimento durante a fase exponencial. Esta observação foi totalmente inesperada, dado que já se observou que, por exemplo, a dose estacionária mencionada causa uma modificação da composição membranar, que altera as suas características biofísicas e a torna mais impermeável ao H_2O_2 (Branco *et al.*, 2004, Folmer *et al.*, 2008, Pedroso *et al.*, 2012, Pedroso *et al.*, 2009), como um mecanismo de proteção celular.

Já se observou que o método de exposição das células ao H_2O_2 poder ter um grande efeito na resposta observada, podendo-se obter resultados diferentes com adições bolus em relação ao estado estacionário (Matias *et al.*, 2011, Oliveira-Marques *et al.*, 2007), o

que é concordante com as diferentes observações efetuadas dependendo do método utilizado para sujeitar as células ao H₂O₂.

4.4.2 Compromisso entre a resposta ao *stress* induzido pelo H₂O₂ com a proliferação celular

Há várias evidências que sugerem que existe um compromisso entre a proliferação celular e a resposta a *stresses*, nomeadamente, ao oxidativo induzido pelo H₂O₂. Por exemplo, já se observou que adições bolus deste oxidante causam uma redução dos níveis de proteínas envolvidas na biossíntese de nucleótidos e proteica (Godon *et al.*, 1998). Desta forma, aparenta ocorrer um desinvestimento no ciclo de divisão celular e produção de biomassa acompanhado de um redirecionamento de recursos para a resposta ao *stress* oxidativo (Godon *et al.*, 1998). Além disso, parece que a redução da taxa de crescimento da *S. cerevisiae* faz parte da resposta contra o *stress* oxidativo severo (Zakrzewska *et al.*, 2011).

Aparentemente, durante a fase exponencial, a *S. cerevisiae* é capaz de responder de forma a resistir aos efeitos tóxicos do H₂O₂ sem, praticamente, afetar proliferação celular, uma vez que a taxa de crescimento durante esta fase decresceu apenas 4% (para ambos os métodos de administração). Estas observações sugerem um compromisso entre a resposta a *stress* e a proliferação celular muito pouco acentuado, ao contrário do que é normal. No entanto, o desvio energético para a divisão celular das culturas expostas às adições bolus no período final da fase exponencial é inferior em relação às culturas controlo, revelando o tal compromisso entre a divisão celular e a resposta a *stresses*. Pelo contrário, no caso das culturas expostas a uma dose estacionária de H₂O₂, nenhum dos aproveitamentos energéticos é afetado em relação às culturas controlo. Esta observação é concordante com o baixo efeito que a exposição ao H₂O₂ por este método apresenta sobre

o calor libertado pelas culturas de *S. cerevisiae* e com a resposta diferencial entre estas culturas e as expostas a adições bolus. Aliás, a exposição das células de *S. cerevisiae* durante a fase exponencial à dose estacionária de H₂O₂, favorece a proliferação celular na fase pós-diáuxica, uma vez que a sua taxa de crescimento aumenta ~ 33 % em relação à das culturas controlo, resultando num número de células final 20 % maior. Assim a exposição a uma dose estacionária de H₂O₂ facilita a adaptação celular ao *stress* oxidativo associado ao metabolismo respiratório da fase pós-diáuxica. Deste modo, a análise do ciclo celular completo destas culturas, revela que a exposição a uma dose estacionária de H₂O₂ induz adaptação e simultaneamente um aumento da proliferação celular, o que contradiz o compromisso entre proliferação e resistência ao *stress* usualmente assumido na literatura.

Concluindo, os efeitos produzidos por estes dois métodos de exposição ao H₂O₂ são quase opostos, uma vez que parece a dose estacionária deste oxidante favorece a proliferação celular durante a fase pós-diáuxica, enquanto adições bolus dificultam a proliferação celular durante o final da fase exponencial, uma vez que é necessário uma maior quantidade de energia total para igual valor despendido na divisão celular. Além disso, neste caso e ao longo de todo este trabalho, detetou-se que o *stress* oxidativo induzido por adições pulsadas de H₂O₂ causa uma perturbação e exige uma resposta celular maiores que por uma adição contínua, tal como já foi detetado por Doskey *et al.* (Doskey *et al.*, 2015). Assim, é possível que um *stress* contínuo conduza a uma resposta mais eficiente que um *stress* em pulsos. Uma possível justificação para esta hipótese é o facto de, para um *stress* em pulsos, a população gerar uma resposta quando exposta ao *stress*, mas relaxar quando o estímulo cessa, o que não acontece para um *stress* contínuo.

5. Perspetivas

Como já se mencionou, uma das principais conclusões deste trabalho foi que a potência dissipada por célula varia continuamente ao longo do crescimento da *S. cerevisiae*. O próximo passo associado a este resultado poderá ser acompanhar este fenómeno conjuntamente com a concentração de alguns metabolitos como a glucose ou o etanol, com o consumo de O₂ e, possivelmente, a variação dos níveis de algumas proteínas específicas de cada fase de crescimento.

Quanto ao desvio energético para a divisão celular da *S. cerevisiae*, percebeu-se que este varia ao longo do crescimento, estando associado a um metabolismo muito pouco eficiente durante a fase exponencial, ao contrário do que acontece na fase pós-diáuxica. O passo seguinte poderá ser o de avaliar o efeito de alterações na concentração de glucose. Este procedimento vai servir para testar se alterações na concentração de glucose disponível afetam a eficiência do seu consumo. Esta ideia surge do facto de existirem vários mecanismos de controlo de qualidade do meio que regulam a resposta celular consoante o seu conteúdo nutritivo (Smets *et al.*, 2010). Assim, pode ser que, por exemplo, uma redução da concentração de glucose leve a um tipo de metabolismo catalítico com um desperdício energético menos acentuado.

Outra possibilidade é a de realizar os estudos efetuados neste trabalho utilizando células cancerosas. Estas têm um metabolismo muito característico, sendo que o seu consumo da glucose é semelhante ao das células de *S. cerevisiae* em fase exponencial, como já foi mencionado. Esta análise poderá trazer grandes progressos no conhecimento do seu metabolismo.

A partir dos dados deste trabalho, parece que os GPx e os Prx e/ou o CCP parecem ter uma importância relativa maior que a catalase para a resposta imediata contra o H₂O₂, no entanto, isto não foi testado experimentalmente. Para avaliar esta hipótese poder-se-á

utilizar estirpes mutantes com deleções nos genes associados aos enzimas mencionados para perceber a sua importância relativa no consumo imediato do H_2O_2 observado calorimetricamente.

Observou-se uma redução da entalpia de fermentação da glucose quando as culturas de *S. cerevisiae* foram expostas a adições bolus de H_2O_2 em relação às controlo, o que não ocorreu quando expostas à dose estacionária estudada. Propôs-se que o efeito associado às culturas com adições bolus se deve ao desvio de glucose da via fermentativa para a via dos fosfatos de pentose. Assim, pode-se prosseguir esta análise com estirpes mutantes com deleções de alguns genes associados a enzimas desta via para avaliar se a sua inibição afeta o valor de entalpia referido, elucidando o papel desta via no valor calculado.

Por último, pretende-se tentar aplicar o microcalorímetro estático *Thermal Activity Monitor* ao estudo de microrganismos, como foi feito com o utilizado neste trabalho. Neste calorímetro, observa-se a resposta celular aos estímulos a que as células são expostas no momento em que este é efetuado, uma vez que a cultura se encontra permanentemente na célula calorimétrica,.

6. Referências

Nota: a referência [5] será citada como Braissant *et al.*, 2010a para ser distinguida da referência [4]. A referência [46] será citada como Marinho *et al.*, 2013a para a distinguir da [45].

- [1] R. Alberty, “Thermodynamic of biochemical reactions.”, Wiley-Interscience, New Jersey, pp. 80, 2003.
- [2] C. E. S. Bernardes, “CBCAL 1.0: A program for calorimeter control and data acquisition.”, (Lisbon: FCUL).
- [3] M. L. Bianconi, “Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions.”, *Biophys. Chem.*, vol. 126, no. 1–3, pp. 59–64, 2007.
- [4] O. Braissant, G. Bonkat, D. Wirz, and a. Bachmann, “Microbial growth and isothermal microcalorimetry: Growth models and their application to microcalorimetric data.”, *Thermochim. Acta*, vol. 555, pp. 64–71, 2013.
- [5] O. Braissant, D. Wirz, B. Göpfert, and a. U. Daniels, “Biomedical use of isothermal microcalorimeters.”, *Sensors (Switzerland)*, vol. 10, no. 10, pp. 9369–9383, 2010.
- [6] O. Braissant, D. Wirz, B. Göpfert, and A. U. Daniels, “Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities.”, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 303, no. 1, pp. 1–8, 2010.
- [7] M. R. Branco, H. S. Marinho, L. Cyrne, and F. Antunes, “Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *S. cerevisiae*.”, *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 8, pp. 6501–6506, 2004.
- [8] J. Brejning, N. Arneborg, and L. Jespersen, “Identification of genes and proteins induced during the lag and early exponential phase of lager brewing yeasts.”, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 98, no. 2, pp. 261–271, 2005.
- [9] J. Brejning, L. Jespersen, and N. Arneborg, “Genome-wide transcriptional changes during the lag phase of *S. cerevisiae*.”, *Arch. Microbiol.*, vol. 179, no. 4, pp. 278–294, 2003.
- [10] R. H. Burdon, V. Gill, and C. Rice-Evans, “Cell proliferation and oxidative stress.”, *Free Radic. Res. Commun.*, vol. 7, no. 3–6, pp. 149–159, 1989.

- [11] M. Čáp, L. Štěpánek, K. Harant, L. Váchová, and Z. Palková, "Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism.", *Mol. Cell*, vol. 46, no. 4, pp. 436–448, 2012.
- [12] B. Chance, H. Sies, and a Boveris, "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.", *Physiol. Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 527–605, 1979.
- [13] F. a Chandra, G. Buzi, and J. C. Doyle, "Glycolytic oscillations and limits on robust efficiency.", *Science*, vol. 333, no. 6039, pp. 187–192, 2011.
- [14] L. Cyrne, F. Antunes, A. Sousa-Lopes, J. Diaz-Bérrio, and H. S. Marinho, "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is largely unresponsive to low regulatory levels of hydrogen peroxide in *S. cerevisiae*.", *BMC Biochem.*, vol. 11, no. 1, p. 49, 2010.
- [15] L. Cyrne, L. u. Martins, L. Fernandes, and H. S. Marinho, "Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *S. cerevisiae* during stationary phase.", *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 34, no. 3, pp. 385–393, 2003.
- [16] V. de Oliveira-Marques, L. Cyrne, H. S. Marinho, and F. Antunes, "A quantitative study of NF-kappaB activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha.", *J. Immunol.*, vol. 178, no. 6, pp. 3893–3902, 2007.
- [17] R. Diaz-Ruiz, S. Uribe-Carvajal, a. Devin, and M. Rigoulet, "Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism.", *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1796, no. 2, pp. 252–265, 2009.
- [18] U. H. Dormer, J. Westwater, D. W. S. Stephen, and D. J. Jamieson, "Oxidant regulation of the *S. cerevisiae* GSH1 gene.", *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, vol. 1576, no. 1–2, pp. 23–29, 2002.
- [19] C. M. Doskey, T. J. van 't Erve, B. a. Wagner, and G. R. Buettner, "Moles of a Substance per Cell Is a Highly Informative Dosing Metric in Cell Culture.", *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132572, 2015.
- [20] J. Flattery-O'Brien, L. P. Collinson, and I. W. Dawes, "*S. cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide.", *J. Gen. Microbiol.*, vol. 139, no. 3, pp. 501–507, 1993.
- [21] V. Folmer, N. Pedroso, A. C. Matias, S. C. D. N. Lopes, F. Antunes, L. Cyrne, and H. S. Marinho, "H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *S. cerevisiae*.", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1778, no. 4, pp. 1141–1147, 2008.

- [22] H. J. Forman, M. Maiorino, and F. Ursini, "Signaling functions of reactive oxygen species.", *Biochemistry*, vol. 49, no. 5, pp. 835–842, 2010.
- [23] B. Futcher, "Metabolic cycle, cell cycle, and the finishing kick to Start.", *Genome Biol.*, vol. 7, no. 4, p. 107, 2006.
- [24] A. Garedew, E. Schmolz, and I. Lamprecht, "Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods.", *Thermochim. Acta*, vol. 415, no. 1–2, pp. 99–106, 2004.
- [25] a P. Gasch, P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. O. Brown, "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.", *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, no. 12, pp. 4241–4257, 2000.
- [26] E. M. Gonçalves, A. Joseph, A. C. L. Conceição, and M. E. Minas Da Piedade, "Potentiometric titration study of the temperature and ionic strength dependence of the acidity constants of nicotinic acid (Niacin).", *J. Chem. Eng. Data*, vol. 56, no. 6, pp. 2964–2970, 2011.
- [27] E.B. Gralla, Superoxide Dismutase: Studies in the Yeast *S. cerevisiae*, in: J.Scandalios (Ed.), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997, pp. 495-525.
- [28] M. Hashimoto and K. Takahashi, "Calorimetric studies of microbial growth: Quantitative relation between growth thermograms and inoculum size.", *Agric. Biol. Chem.*, vol. 46, no. 6, pp. 1559–1564, 1982.
- [29] V. Haurie, M. Perrot, T. Mini, P. Jenö, F. Sagliocco, and H. Boucherie, "The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *S. cerevisiae*.", *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 1, pp. 76–85, 2001.
- [30] J. Higuera-Guisset, J. Rodríguez-Viejo, M. Chacón, F. J. Muñoz, N. Vigués, and J. Mas, "Calorimetry of microbial growth using a thermopile based microreactor.", *Thermochim. Acta*, vol. 427, no. 1–2, pp. 187–191, 2005.
- [31] A. Ikner and K. Shiozaki, "Yeast signaling pathways in the oxidative stress response.", *Mutat. Res.*, vol. 569, no. 1–2, pp. 13–27, 2005.
- [32] S. Izawa, Y. Inoue, and a Kimura, "Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *S. cerevisiae*.", *Biochem. J.*, vol. 320 (Pt 1), pp. 61–67, 1996.

- [33] D. J. Jamieson, "Oxidative stress responses of the yeast *S. cerevisiae*.", *Yeast*, vol. 14, no. 16, pp. 1511–1527, 1998.
- [34] D. J. Jamiesont, "adaptive responses to both hydrogen peroxide *S. cerevisiae* Has Distinct Adaptive Responses to Both Hydrogen Peroxide and Menadione.", vol. 174, no. 20, pp. 6678–6681, 1992.
- [35] C. Godon, G. Lagniel, J. Lee, J. Buhler, S. Kieffer, M. Perroti, H. Boucheriei, M. B. Toledano and J. Labarre, "The H₂O₂ Stimulon in.", *Biochemistry*, vol. 273, no. 34, pp. 22480 –22489, 1998.
- [36] I. Lamprecht, B. Schaarschmidt and G. Welge, "Microcalorimetric investigations of the metabolism of yeasts.", *Rad. and Environm. Biophys*, vol. 13, pp. 57-61, 1976.
- [37] I. Lamprecht, "Calorimetry and thermodynamics of living systems.", *Thermochim. Acta*, vol. 405, no. 1, pp. 1–13, 2003.
- [38] C. Larsson, G. Lidh, a. Blomberg, C. Niklasson, and L. Gustafsson, "Monitoring and control of batch and fed-batch cultures of *S. cerevisiae* by calorimetry.", *Pure Appl. Chem.*, vol. 65, no. 9, pp. 1933–1937, 1993.
- [39] J. a. Leopold and J. Loscalzo, "Oxidative enzymopathies and vascular disease - ATVB in focus.", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1332–1340, 2005.
- [40] M. Leskiv, C. E. S. Bernardes, and M. E. Minas da Piedade, "A calorimetric system based on the LKB 10700-1 flow microcalorimeter.", *Meas. Sci. Technol.*, vol. 20, no. 7, p. 075107, 2009.
- [41] X. Li, Y. Liu, R. Zhao, J. Wu, X. Shen, and S. Qu, "Microcalorimetric study of *Escherichia coli* growth inhibited by the selenomorpholine complexes.", *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 75, no. 1–3, pp. 167–175, 2000.
- [42] V.D. Longo, E.B. Gralla, J.S. Valentine, "Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *S. cerevisiae*", *J. Biol. Chem.* vol. 271, pp. 12275-12280, 1996.
- [43] López-Lázaro, Miguel. "The Warburg Effect: Why and How Do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen?" *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 8 vol. 3, pp. 305–312, 2008.
- [44] A. N. Macintyre and J. C. Rathmell, "Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis.", *Cancer Metab.*, vol. 1, no. 1, p. 5, 2013.

- [45] K. Mahadev, A. Zilbering, L. Zhu, and B. J. Goldstein, "Insulin-stimulated Hydrogen Peroxide Reversibly Inhibits Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Vivo and Enhances the Early Insulin Action Cascade.", *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 24, pp. 21938–21942, 2001.
- [46] H. S. Marinho, L. Cyrne, E. Cadenas, and F. Antunes, *The cellular steady-state of H₂O₂: Latency concepts and gradients*, 1st ed., vol. 527. Elsevier Inc., 2013.
- [47] H. S. Marinho, L. Cyrne, E. Cadenas, and F. Antunes, "H₂O₂ delivery to cells: Steady-state versus bolus addition.", *Methods Enzymol.*, vol. 526, pp. 159–173, 2013.
- [48] H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, and F. Antunes, "Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors.", *Redox Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 535–562, 2014.
- [49] A. C. Matias, H. S. Marinho, L. Cyrne, E. Herrero, and F. Antunes, "Biphasic modulation of fatty acid synthase by hydrogen peroxide in *S. cerevisiae*.", *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 515, no. 1–2, pp. 107–111, 2011.
- [50] A. C. Matias, N. Pedroso, N. Teodoro, H. S. Marinho, F. Antunes, J. M. Nogueira, E. Herrero, and L. Cyrne, "Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *S. cerevisiae* cells to H₂O₂.", *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 10, pp. 1458–1465, 2007.
- [51] Matthew J. Brauer, Alok J. Saldanha, Kara Dolinski and David Botstein, "Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures" *Mol. Bio. Cell*, vol. 16, pp. 2503-2517, 2005
- [52] Matthew J. Brauer, Curtis Huttenhower, _ Edoardo M. Airoidi, Rachel Rosenstein, John C. Matese, David Gresham, Viktor M. Boer, Olga G. Troyanskaya, and David Botstein, "Coordination of growth rate, cell cycle, stress response and metabolic activity in yeast" *Mol. Bio. Cell*, vol. 19, pp. 352-367, 2008
- [53] S. L. Miller, D. Smith-Magowan, and D. Smith-magowana, "The Thermodynamics of the Krebs Cycle and Related Compounds.", *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 19, no. 4, pp. 1049–1073, 1990.
- [54] K. I. Minard and L. McAlister-Henn, "Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast.", *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, no. 6, pp. 832–843, 2001.

- [55] D. P. Nelson and Lutz A. Kiesow, "Enthalpy Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25°C (with Molar Extinction Coefficients of H₂O₂ Solutions in the UV).", *Anal. Bio.*, vol. 474478, pp. 474–478, 1972.
- [56] M. a a O'Neill, a. E. Beezer, C. Labetoulle, L. Nicolaides, J. C. Mitchell, J. a. Orchard, J. a. Connor, R. B. Kemp, and D. Olomolaiye, "The base catalysed hydrolysis of methyl paraben: A test reaction for flow microcalorimeters used for determination of both kinetic and thermodynamic parameters.", *Thermochim. Acta*, vol. 399, no. 1–2, pp. 63–71, 2003.
- [57] N. Pedroso, P. Gomes-Alves, H. Susana Marinho, V. B. Brito, C. Boada, F. Antunes, E. Herrero, D. Penque, and L. Cyrne, "The plasma membrane-enriched fraction proteome response during adaptation to hydrogen peroxide in *S. cerevisiae*.", *Free Radic. Res.*, vol. 46, no. 10, pp. 1267–1279, 2012.
- [58] N. Pedroso, A. C. Matias, L. Cyrne, F. Antunes, C. Borges, R. Malhó, R. F. M. de Almeida, E. Herrero, and H. S. Marinho, "Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *S. cerevisiae*.", *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 46, no. 2, pp. 289–298, 2009.
- [59] M. D. Rolfe, C. J. Rice, S. Lucchini, C. Pin, A. Thompson, A. D. S. Cameron, M. Alston, M. F. Stringer, R. P. Betts, J. Baranyi, M. W. Peck, and J. C. D. Hinton, "Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation.", *J. Bacteriol.*, vol. 194, no. 3, pp. 686–701, 2012.
- [60] D. Roy and R. Samson, "Investigation of growth and metabolism of *S. cerevisiae* (baker's yeast) using microcalorimetry and bioluminometry.", *J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 3, pp. 193–205, 1988.
- [61] B. Schaarschmidt and I. Lamprecht, "Calorimetric Characterization of Microorganisms" *Generalia*, Experientia 32/10, pp. 1230–1234, 1976.
- [62] B. Schaarschmidt and I. Lamprecht, "Microcalorimetric study of yeast growth, utilization of diferente carbohydrates.", *Therm. Acta*, vol. 22, pp. 333–338, 1978
- [63] a. Schiraldi, "Microbial growth and metabolism: Modelling and calorimetric characterization.", *Pure Appl. Chem.*, vol. 67, no. 11, pp. 1873–1878, 1995.

- [64] V. A. Semedo “Estudo Calorimétrico do efeito do H_2O_2 no metabolismo da *S. cerevisiae*”. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa (Tese de Mestrado), 2014.
- [65] N. Slavov, J. Macinskas, a. Caudy, and D. Botstein, “Metabolic cycling without cell division cycling in respiring yeast.”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 47, pp. 19090–19095, 2011.
- [66] N. Slavov, B. a. Budnik, D. Schwab, E. M. Airoidi, and A. van Oudenaarden, “Constant Growth Rate Can Be Supported by Decreasing Energy Flux and Increasing Aerobic Glycolysis.”, *Cell Rep.*, vol. 7, no. 3, pp. 705–714, 2014.
- [67] B. Smets, R. Ghillebert, P. De Snijder, M. Binda, E. Swinnen, C. De Virgilio, and J. Winderickx, *Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in S. cerevisiae*, vol. 56, no. 1. 2010.
- [68] a. Sousa-Lopes, F. Antunes, L. Cyrne, and H. S. Marinho, “Decreased cellular permeability to H_2O_2 protects *S. cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress.”, *FEBS Lett.*, vol. 578, no. 1–2, pp. 152–156, 2004.
- [69] M. D. Temple, G. G. Perrone, and I. W. Dawes, “Complex cellular responses to reactive oxygen species.”, *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 319–326, 2005.
- [70] L. Váchová, M. Čáp, and Z. Palková, “Yeast colonies: A model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity.”, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2012, 2012.
- [71] M. Werner-Washburne, E. Braun, G.C. Johnston, R.A. Singer, Stationary phase in the yeast *S. cerevisiae*, *Microbiol.* vol. 57 pp. 383-401, 1993.
- [72] E. a Winzeler, D. D. Shoemaker, a Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, a M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, a Lucau-Danila, M. Lussier, N. M’Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Véronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston, and R. W. Davis, “Functional

characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis.”, *Science*, vol. 285, no. 5429, pp. 901–906, 1999.

[73] S. Yonsel, G. Bulbül-Çaliskan, M. Köni, and L. Dagasan, “Monitoring of yeast metabolism with calorimetry.”, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, vol. 21, no. 4, pp. 395–408, 2007.

[74] S. K. Yoo, T. W. Starnes, Q. Deng, and A. Huttenlocher, “Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo.”, *Nature*, vol. 480, no. 7375, pp. 109–112, 2011.

[75] a. Zakrzewska, G. van Eikenhorst, J. E. C. Burggraaff, D. J. Vis, H. Hoefsloot, D. Delneri, S. G. Oliver, S. Brul, and G. J. Smits, “Genome-wide analysis of yeast stress survival and tolerance acquisition to analyze the central trade-off between growth rate and cellular robustness.”, *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 22, pp. 4435–4446, 2011.

[76] C. Zhang, M. Yuan, Y. Wei, F. Xu, J. Yu, and H. Cao, “Determination of enzymatic reaction enthalpy by simultaneous calorimetry and spectrophotometry.”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 120, no. 1, pp. 283–288, 2014.

[77] Y. Zhao, H. Liu, A. I. Riker, O. Fodstad, S. P. Ledoux, G. L. Wilson, and M. Tan, “Emerging metabolic targets in cancer therapy.”, *Front. Biosci.*, vol. 16, pp. 1844–1860, 2011.

[78] S. Zheng, J. Hu, K. Chen, J. Yao, Z. Yu, and X. Lin, “Soil microbial activity measured by microcalorimetry in response to long-term fertilization regimes and available phosphorous on heat evolution.”, *Soil Biol. Biochem.*, vol. 41, no. 10, pp. 2094–2099, 2009.

7. Anexos

Nos quadros seguintes apresentam-se os valores individuais dos replicados que deram origem às observações apresentadas no texto principal. Os valores rasurados indicam valores desprezados para o cálculo das medidas estatísticas. O critério para desprezar estes valores foi o de estarem dentro ou fora do intervalo de confiança a 95 % (ou 99 % no caso de experiências com uma dispersão muito baixa).

Quadro A1. Constante de calibração do calorímetro obtida com H₂O, meio e culturas em fase estacionária.

	$\Delta t/s$	P/W	A/ $\mu V \cdot s$	$\varepsilon (\mu W \cdot \mu V^{-1})$	Média	Média ponderada
H ₂ O	20	4707,906	6031,571	15,611	15,52±0,07	15,5±0,2
	39	4686,016	11872,635	15,393		
	62	4665,902	18636,908	15,522		
	301	441,605	8571,27	15,508		
	306	441,605	8781,215	15,389		
	307	441,605	8729,413	15,531		
	82	1800,813	9470,323	15,593		
	101	2496,769	16205,01	15,561		
	120	1217,54	9372,35	15,589		
	1802	4639,222	537925,019	15,541		
	1801	4635,288	540100,786	15,457		
	1801	4636,748	537880,257	15,525		
Meio	300	441,738	8731,871	15,177		

	300	441,738	8743,084	15,157	15,3±0,2	
	300	441,738	8753,466	15,139		
	307	243,093	4915,712	15,182		
	21	4685,622	6521,531	15,088		
	38	3925,427	9920,176	15,037		
	63	1877,963	7638,883	15,488		
	1804	4638,979	543642,172	15,394		
	1802	4634,238	541967,306	15,408		
	1803	4633,51	542782,044	15,391		
	81	4154,026	21954,825	15,326		
	104	1649,312	11228,746	15,276		
	121	4655,368	36340,697	15,501		
	121	4638,171	36526,328	15,365		
	123	4634,293	36822,706	15,48		
	1802	4652,251	539594,872	15,536		
	1802	4651,114	540369,724	15,51		
	1803	4654,349	541619,504	15,494		
cultura	39	4694,495	11986,851	15,274	15,5±0,4	
	60	4676,124	18594,58	15,089		
	61	4690,415	19702,986	14,521		
	73	429,028	2014,222	15,549		
	306	313,258	6166,405	15,545		
	320	216,118	4413,331	15,67		
	20	4723,864	6101,193	15,485		

102	1750,123	11299,719	15,798
124	2177,123	17189,049	15,706
1803	4654,497	534167,681	15,711
1803	4649,524	533383,326	15,717

Quadro A2. Número de células/mL de *S. cerevisiae* associadas a 1 OD₆₀₀.

Fator de conversão OD ₆₀₀ – células/mL	
Experiência 1	$3,01 \times 10^7$
Experiência 2	$2,94 \times 10^7$
Experiência 3	$3,02 \times 10^7$
Experiência 4	$2,77 \times 10^7$
Experiência 5	$2,73 \times 10^7$
Média	$(2,94 \pm 0,12) \times 10^7$

Quadro A3. Descrição do valor de potência dissipada por célula em vários momentos característicos do crescimento, para as culturas controle de *S. cerevisiae*.

Culturas controle	t _{Potência/célula mínima/h}	Valor da Potência dissipada por célula em diferentes momentos (pW/célula)						
		Início da fase lag	Mínimo	Fim da queda rápida da exponencial	Transição diáuxica	Fim da remodelação metabólica da fase pós-diáuxica	Início da fase estacionária	Fase estacionária
Experiência 1	2,5	7,0	40	26	-1,8	12	8,7	1,2
Experiência 2	2,6	8,4	41	—	15,7	16	8,6	0,9
Experiência 3	2,6	6,3	41	23	15,3	14	5,4	1,5
Experiência 4	3,5	6,4	27	—	16,5	16	6,5	0,9
Experiência 5	4,4	18,5	34	28	0,4	14	-0,6	0,6
Experiência 6	3,1	15,9	62	32	16,0	16	10,9	2,0
Experiência 7	2,8	8,3	32	28	16,2	—	-0,5	0,6
Experiência 8	3,0	7,7	32	18	—	—	6,9	0,7
Média	2,9±0,4	7,4±0,9	37±4	27±3	15,9±0,5	15±1	7,8±2,0	0,9±0,3

Quadro A4. Valor da variação potência dissipada por célula ao longo do crescimento, para as culturas controle de *S. cerevisiae*.

Culturas controle	pW·célula ⁻¹ ·h ⁻¹					Tempo da mudança diáuxica/h	Duração da fase pós-diáuxica/h	Tempo de remodelação/h
	Declive da fase lag	Declive da queda rápida durante a fase exponencial	Declive lento durante a fase exponencial	Declive da fase pós-diáuxica	Declive da remodelação metabólica da fase pós-diáuxica			
Experiência 1	-17,3	17	1,7	1,08	0,4	13,1	6,5	1,3
Experiência 2	-17,0	—	3,6	1,10	0,2	10,0	6,4	1,2
Experiência 3	-24,4	9	1,3	1,31	1,8	10,6	6,4	1,9
Experiência 4	-10,3	—	1,1	1,85	0,6	11,0	6,3	2,3
Experiência 5	-24,0	5	3,3	1,11	0,3	10,5	5,9	1,4
Experiência 6	-26,9	10	3,7	0,352	0,3	10,4	5,9	2,2
Experiência 7	-15,7	7	1,1	1,60	—	11,3	4,7	—
Experiência 8	-61,5	14	3,2	—	—	—	—	—
Média	-18±5	9±4	2,8±1,0	1,2±0,2	0,36±0,13	10,7±0,5	6,2±0,4	1,7±0,5

Quadro A5. Descrição das curvas P - t , para as culturas controlo de *S. cerevisiae*.

Culturas controlo	t_{transição} diáuxica/h	P_{mínimo}/μW	P_{transição} diáuxica/μW	t_{pico} da exponencial/h	P_{fase} estacionária/μW	P_{fase lag}/μW	Duração da fase pós- diáuxica/h	A_{fase lag-pós- diáuxica}/J	A_{fase lag- estacionária}/J
Experiência 1	14,2	362,1	292,5	11,0	53,7	3,2	5,6	4,4	10,3
Experiência 2	11,2	281,7	338,8	————	32,4	3,9	5,2	4	9,2
Experiência 3	12,2	330,6	296,5	9,5	42,3	-6,2	4,8	4,2	8,8
Experiência 4	13,3	314,2	293,9	9,6	28,8	3,0	4,5	4,7	8,7
Experiência 5	11,7	318,9	293,5	9,2	26,3	6,8	4,2	4,2	8,4
Experiência 6	12,3	330,3	345,6	9,2	46,3	2,0	4,3	5,2	9,2
Experiência 7	11,0	315,3	321,4	9,1	32,9	4,4	4,9	3,7	8,5
Experiência 8	11,0	336,9	329,9	9,3	36,0	2,6	5,1	3,6	8,7
Média	11,8±0,8	324±9	304±17	9,3±0,2	36±5	3,6±1,4	4,8±0,3	4,2±0,3	8,8±0,3

Quadro A6. Descrição das curvas P - t , para as culturas expostas a adições bolus de H_2O_2 .

Culturas com adições bolus de H_2O_2	$t_{transição}$ diáuxica/h	$P_{mínimo}/\mu W$	$P_{transição}$ diáuxica/μW	t_{pico} da exponencial/h	P_{fase} estacionária/μW	Duração da fase pós- diáuxica/h	$A_{fase\ lag-pós-}$ diáuxica/J	$A_{fase\ lag-}$ estacionária/J
Experiência 1	11,0	282	235	8,8	7,9	5,3	3,3	7,2
Experiência 2	12,3	294	280	9,3	24,1	4,4	4,0	7,2
Experiência 3	11,4	283	256	9,1	21,1	4,9	3,5	7,0
Experiência 4	10,0	238	211	8,9	10,6	7,3	3,3	7,1
Experiência 5	12,4	268	240	10,1	2,9	4,6	3,5	6,5
Experiência 6	10,5	274	272	8,2	17,1	4,4	3,4	6,9
Média	11,3±0,9	280±10	257±20	9,0±0,2	9,6±5,9	4,7±0,4	3,4±0,1	7,0±0,3

Quadro A7. Descrição das curvas P - t , para as culturas expostas à dose estacionária de H_2O_2 .

Culturas expostas à dose estacionária	$t_{transição}$ diáuxica/h	$P_{mínimo}/\mu W$	$P_{transição}$ diáuxica/μW	t_{pico} da exponencial/h	P_{fase} estacionária/μW	Duração da fase pós- diáuxica/ h	$A_{fase\ lag-pós-}$ diáuxica/J	$A_{fase\ lag-}$ estacionária/J
Experiência 1	11,3	274	296	8,6	40,0	5,2	3,8	8,4
Experiência 2	11,1	322	307	8,4	35,2	4,8	4,2	8,6
Experiência 3	11,5	285	311	9,1	41,2	5,2	4,0	8,7
Experiência 4	11,3	283	306	8,3	-----	-----	4,0	-----
Experiência 5	12,3	345	334	10,2	54,9	4,8	4,5	9,4
Experiência 6	11,5	305	324	8,7	38,8	4,8	3,9	8,5
Experiência 7	12,4	270	291	8,8	3,5	4,4	3,6	7,1
Média	11,3±0,2	290±20	309±10	8,7±0,3	42,0±7,6	5,0±0,2	4,0±0,2	8,7±0,4

Quadro A8. Análise da variação do direcionamento metabólico para o crescimento celular ao longo das várias fases de crescimento da *S. cerevisiae* para as culturas controle.

Culturas controle	Crescimento seguido pela OD ₆₀₀			Crescimento seguido por calorimetria				Aproveitamento energético para divisão celular por fase de crescimento (μ_{OD} / $\mu_{calorimetria}$)				
	$\mu_{\text{fase lag/h}^{-1}}$	$\mu_{\text{fase exponencial/h}^{-1}}$	$\mu_{\text{fase pós-diáuxica/h}^{-1}}$	$\mu_{\text{fase lag/h}^{-1}}$	$\mu_{\text{fase exponencial/h}^{-1}}$	$\mu_{\text{fase exponencial-pós-diáuxica/h}^{-1}}$	$\mu_{\text{fase pós-diáuxica/h}^{-1}}$	Fase lag	Fase exponencial	Fase final da exponencial	Fase inicial da pós-diáuxica	Fase pós-diáuxica
Experiência 1	0,123	0,354	0,176	1,13	0,32	0,223	0,0687	0,108	1,10	1,59	0,79	2,56
Experiência 2	0,015	0,432	0,172	0,70	0,30	0,183	0,0919	0,021	1,47	2,36	0,94	1,87
Experiência 3	0,046	0,403	0,203	1,30	0,35	0,186	0,0767	0,035	1,14	2,16	1,09	2,65
Experiência 4	0,022	0,379	0,208	0,68	0,33	0,161	0,0433	0,032	1,14	2,35	1,29	4,81
Experiência 5	————	0,438	0,164	0,79	0,35	0,197	0,0558	————	1,25	2,22	0,83	2,93
Experiência 6	0,141	0,447	0,171	1,31	0,31	0,194	————	0,108	1,45	2,31	0,88	————
Experiência 7	0,145	0,395	0,205	0,97	0,35	————	0,0544	0,149	1,14	————	————	3,77
Experiência 8	0,062	0,463	0,150	————	0,45	0,374	0,0700	————	1,02	1,24	0,40	2,14
Média	0,053	0,416	0,177	0,93	0,33	0,197	0,0651	0,071	1,15	2,26	0,91	2,98
Desvio-padrão	0,043	0,027	0,015	0,25	0,02	0,016	0,0097	0,043	0,059	0,087	0,12	0,55

Quadro A9. Análise da variação do direcionamento metabólico para o crescimento celular ao longo das várias fases de crescimento para as culturas expostas a adições bolus de H₂O₂.

Culturas com adições bolus de H ₂ O ₂	Crescimento seguido pela OD ₆₀₀	Crescimento seguido por calorimetria			Aproveitamento energético para divisão celular - μ_{OD} / $\mu_{calorimetria}$	
	$\mu_{\text{fase exponencial}}/\text{h}^{-1}$	$\mu_{\text{fase exponencial}}/\text{h}^{-1}$	$\mu_{\text{fase exponencial-pós-diáuxica}}/\text{h}^{-1}$	$\mu_{\text{fase pós-diáuxica}}/\text{h}^{-1}$	Fase exponencial	Fase final da exponencial
Experiência 1	0,446	0,377	0,227	0,088	1,18	1,96
Experiência 2	0,433	0,320	0,225	0,076	1,35	1,92
Experiência 3	0,429	0,295	0,211	0,089	1,45	2,03
Experiência 4	0,404	—	0,115	0,043	—	3,51
Experiência 5	0,425	0,361	0,219	0,073	1,18	1,94
Experiência 6	0,492	0,410	0,272	0,099	1,20	1,81
Média	0,427±0,015	0,338±0,037	0,221±0,007	0,082±0,008	1,27±0,12	1,93±0,08

Quadro A10. Análise da variação do direcionamento metabólico para o crescimento celular ao longo das várias fases de crescimento para as culturas expostas à dose estacionária de H₂O₂.

Culturas expostas à dose estacionária	Crescimento seguido pela OD ₆₀₀			Crescimento seguido por calorimetria				Aproveitamento energético para divisão celular - μ_{OD} / $\mu_{calorimetria}$				
	$\mu_{fase\ lag/h^{-1}}$	$\mu_{fase\ exponencial/h^{-1}}$	$\mu_{fase\ pós-diáuxica/h^{-1}}$	$\mu_{fase\ lag/h^{-1}}$	$\mu_{fase\ exponencial/h^{-1}}$	$\mu_{fase\ exponencial-pós-diáuxica/h^{-1}}$	$\mu_{fase\ pós-diáuxica/h^{-1}}$	Fase lag	Fase exponencial	Fase final da exponencial	Fase inicial da pós-diáuxica	Fase pós-diáuxica
Experiência 1	0,016	0,420	0,259	————	0,48	0,224	0,041	————	0,88	1,88	1,15	6,27
Experiência 2	0,017	0,400	0,255	————	0,36	0,160	0,069	————	1,11	2,50	1,59	3,69
Experiência 3	0,106	0,461	0,277	1,03	0,33	0,253	0,034	0,10	1,38	1,82	1,09	8,95
Experiência 4	0,084	0,418	0,173	1,29	0,33	0,253	0,084	0,065	1,28	1,65	0,69	2,13
Experiência 5	0,043	0,485	————	————	0,28	0,251	0,064	————	1,75	1,93	————	————
Experiência 6	————	0,393	————	————	0,32	0,150	0,056	————	1,22	2,63	————	————
Experiência 7	————	0,363	————	————	0,36	0,109	0,048	————	1,02	3,33	————	————
Média	0,040	0,418	0,263	1,16	0,34	0,215	0,056	0,084	1,20	2,15	1,12	4,03
Desvio-padrão	0,032	0,027	0,012	0,18	0,02	0,048	0,011	0,027	0,14	0,38	0,04	2,08

Quadro A11. Potência associada à resposta imediata ao H₂O₂ nas culturas de *S. cerevisiae* expostas a uma dose estacionária de H₂O₂.

Culturas expostas à dose estacionária	ΔP (resposta imediata ao H ₂ O ₂)/ $\mu J \times 10^{-6}$	% Metabolismo desviado para resposta imediata ao H ₂ O ₂
Experiência 1	-1,18	5,63
Experiência 2	-1,92	7,88
Experiência 3	-3,95	11,72
Experiência 4	-1,99	8,34
Experiência 5	-2,69	10,48
Experiência 6	-1,87	7,54
Experiência 7	-1,30	9,44
Média	-1,83±0,54	8,74±1,21

Quadro A12. Potência associada à resposta imediata ao H₂O₂ para cada uma das três adições efetuadas, nas culturas de *S. cerevisiae* expostas a adições bolus de H₂O₂.

Culturas com adições bolus de H ₂ O ₂	ΔP (resposta imediata ao H ₂ O ₂)/ $\mu J \times 10^{-6}$			% Metabolismo desviado para resposta imediata ao H ₂ O ₂		
	1ª Adição	2ª Adição	3ª Adição	1ª Adição	2ª Adição	3ª Adição
Experiência 1	-0,98	-1,68	-1,20	4,64	8,08	6,19
Experiência 2	-2,10	-1,49	-2,23	7,95	6,11	9,50
Experiência 3	-1,94	-1,51	-1,20	7,84	6,32	5,81
Experiência 4	-1,43	-1,74	-1,27	6,04	8,12	6,91
Experiência 5	-1,14	1,27	-2,64	6,81	7,87	16,98
Experiência 6	-2,73	-1,74	-2,24	20,15	9,94	10,78
Experiência 7	-1,61	-1,78	————	4,05	10,94	————
Média	-1,64±0,39	-1,66±0,12	-1,80±0,65	6,22±1,62	7,74±1,40	7,84±2,19

Quadro A13. Entalpia de oxidação da glucose a etanol para as culturas controlo. A integração da curva de diferença de potencial em função do tempo foi feita entre o início da fase lag e a transição diáuxica ou o final da fase pós-diáuxica. A constante de calibração usada foi de $15,49 \mu\text{W} \cdot \mu\text{V}^{-1}$ e a quantidade de glucose foi de $4,40 \times 10^{-5} \text{ mol}$.

Culturas controlo	Q/J	$\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{glucose}$
Experiência 1	-4,4	-100
Experiência 2	-4,0	-91
Experiência 3	-4,2	-96
Experiência 4	-4,7	-107
Experiência 5	-4,2	-95
Experiência 6	-3,7	-85
Experiência 7	-5,2	-119
Experiência 8	-3,6	-82
Média	-4,2±0,3	-96±7

Quadro A14. Entalpia de oxidação da glucose a etanol para as culturas expostas a adições bolus de H_2O_2 . A integração da curva de diferença de potencial em função do tempo foi feita entre o início da fase lag e a transição diáuxica ou final da fase pós-diáuxica. A constante de calibração usada foi de $15,49 \mu\text{W} \cdot \mu\text{V}^{-1}$ e a quantidade de glucose foi de $4,40 \times 10^{-5} \text{ mol}$.

Culturas com adições bolus de H_2O_2	Q/J	$\Delta H/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{glucose}$
Experiência 1	-3,3	-75
Experiência 3	-3,5	-80
Experiência 4	-3,3	-75
Experiência 5	-3,5	-81
Experiência 6	-3,4	-76
Média	-3,4±0,1	-77±3

Quadro A15. Entalpia de oxidação da glucose a etanol para as culturas expostas a uma dose estacionária de H₂O₂. A integração da curva de diferença de potencial em função do tempo foi feita entre o início da fase lag e a transição diáuxica ou o final da fase pós-diáuxica. A constante de calibração usada foi de 15,49 $\mu\text{W}\cdot\mu\text{V}^{-1}$ e a quantidade de glucose foi de $4,40\times 10^{-5}$ mol.

Culturas expostas à dose estacionária	Q/J	$\Delta H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{glucose}$
Experiência 1	-3,8	-86
Experiência 2	-4,2	-95
Experiência 3	-4,0	-92
Experiência 4	-4,0	-90
Experiência 5	-4,5	-102
Experiência 6	-3,9	-89
Experiência 7	-3,6	-81
Média	-4,0±0,2	-90±4

Quadro A16. Análise do efeito de adições bolus de H₂O₂ sobre o crescimento celular a partir dos μ da fase exponencial, em culturas preparadas a partir da mesma cultura inicial.

Culturas com adições bolus de H₂O₂	μ/h^{-1} – cultura controle	μ/h^{-1} – cultura exposta a H₂O₂	Desvio por experiência (%)
Experiência 1	0,379	0,376	0,71
Experiência 2	0,455	0,425	6,64
Experiência 3	0,428	0,387	9,59
Experiência 4	0,409	0,393	3,91
Experiência 5	0,456	0,433	5,08
Experiência 6	0,445	0,429	3,67
Experiência 7	0,438	0,428	2,21
Experiência 8	0,411	0,404	1,62
Experiência 9	0,426	0,423	0,91
Experiência 10	0,451	0,412	8,56
Experiência 11	0,455	0,450	1,03
Experiência 12	0,452	0,399	11,81
Experiência 13	0,439	0,424	3,46
Experiência 14	0,504	0,492	2,36
Experiência 15	0,472	0,413	12,51
Desvio (%)	4,94		

Quadro A17. Análise do efeito da dose estacionária de H₂O₂ sobre o crescimento celular a partir dos μ da fase exponencial, em culturas preparadas a partir da mesma cultura inicial.

Culturas expostas à dose estacionária	μ/h^{-1} – cultura controle	μ/h^{-1} – cultura exposta a H₂O₂	Desvio por experiência (%)
Experiência 1	0,439	0,420	4,31
Experiência 2	0,432	0,400	7,41
Experiência 3	0,460	0,461	-0,28
Experiência 4	0,444	0,418	6,07
Experiência 5	0,474	0,485	-2,35
Experiência 6	0,418	0,393	6,12
Experiência 7	0,398	0,363	8,98
Desvio (%)	4,32		

Quadro A18. Densidade ótica determinada na transição diáuxica e no início da fase estacionária.

	Culturas controle		Culturas expostas a adições bolus de H ₂ O ₂	Culturas expostas a uma dose estacionária de H ₂ O ₂	
	OD ₆₀₀ (fase estacionária)	OD ₆₀₀ (transição diáuxica)	OD ₆₀₀ (fase estacionária)	OD ₆₀₀ (fase estacionária)	OD ₆₀₀ (transição diáuxica)
Experiência 1	4,1	2,1	3,5	4,1	2,2
Experiência 2	3,4	1,6	3,3	4,8	1,8
Experiência 3	3,8	1,7	3,4	3,5	1,6
Experiência 4	3,8	1,6	2,8	—	2,0
Experiência 5	4,7	1,9	—	5,0	—
Experiência 6	3,1	1,8	3,6	4,6	—
Experiência 7	3,4	1,5	—	—	—
Experiência 8	3,6	2,6	—	—	—
Média	3,7±0,3	1,8±0,2	3,5±0,1	4,6±0,4	1,9±0,3

Quadro A19. Descrição do comportamento oscilatório observado por calorimetria em termos de potência total.

Culturas controle	Amplitude/ μ W			Período/min			Amplitude da oscilação/valor global de Potência (%)		
	Meio da fase exponencial	Fim da fase exponencial	Fase pós-diáuxica	Meio da fase exponencial	Fim da fase exponencial	Fase pós-diáuxica	Meio da fase exponencial	Fim da fase exponencial	Fase pós-diáuxica
Experiência 1	-4,6	-6,8	-7,6	29,0	19,7	3,4	3,9	3,0	2,2
Experiência 2	-5,4	-10,7	-9,6	11,9	10,2	6,9	4,4	5,0	2,9
Experiência 3	-3,4	-6,3	-8,8	22,0	6,2	7,9	2,6	2,7	2,9
Experiência 4	-3,2	-9,9	-6,8	5,0	3,2	2,8	3,9	4,8	2,2
Experiência 5	-5,1	-8,2	-12,3	5,2	5,0	4,2	3,5	3,6	4,0
Experiência 6	-6,5	-7,7	-11,0	2,1	2,2	2,7	4,1	3,1	3,4
Experiência 7	-5,3	-8,8	-9,8	4,1	3,5	5,0	3,5	3,3	3,0
Experiência 8	-5,0	-10,8	-13,4	4,5	4,9	5,0	4,5	4,0	4,1
média	-4,8	-8,7	-9,9	10,5	6,9	4,7	3,8	3,7	3,1
desvio-padrão	1,1	1,7	2,2	9,9	5,7	1,90	0,6	0,8	0,7

Quadro A20. Descrição do comportamento oscilatório observado por calorimetria em termos de potência por célula.

Culturas controle	Potência·célula⁻¹/pW·célula⁻¹			Amplitude da oscilação/valor global de Potência (%)		
	Meio da fase exponencial	Fim da fase exponencial	Fase pós- diáuxica	Meio da fase exponencial	Fim da fase exponencial	Fase pós- diáuxica
Experiência 1	-0,56	-0,31	-0,18	3,2	1,7	1,8
Experiência 2	-0,88	-0,65	-0,33	2,7	2,0	1,3
Experiência 3	-0,51	-0,41	-0,28	1,8	1,5	1,2
Experiência 4	-0,84	-0,73	-0,15	5,5	4,7	1,2
Experiência 5	-0,59	-0,44	-0,37	1,6	1,2	1,3
Experiência 6	-0,77	-0,46	-0,41	1,9	1,1	1,7
Experiência 7	-0,84	-0,59	-0,23	3,7	2,6	1,4
Experiência 8	-0,53	-0,50	-0,097	5,5	5,2	1,1
Média	-0,69	-0,51	-0,26	3,2	2,5	1,4
desvio-padrão	0,16	0,14	0,11	1,6	1,6	0,3